

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590991
 研究課題名（和文）
 変異SOD1導入グリア細胞の運動ニューロン傷害機序と細胞内骨格の動態解析
 研究課題名（英文）
 Analysis of the mutated SOD1 astrocyte-releasing factors toxic to motor neurons
 研究代表者
 永井 真貴子（NAGAI MAKIKO）
 岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
 研究者番号：80420488

研究成果の概要：

本研究ではin vitroの系を用いてグリアからのシグナルが運動ニューロンに与える影響を明らかにした。実験材料として変異 SOD1 (G93A) を導入したトランスジェニックマウス（筋萎縮性側索硬化症モデルマウス）を用いた。変異 SOD1 を発現したアストロサイト上の運動ニューロンは生存率が低下、細胞体の面積が小さく軸索が短かった。Bax inhibitor である V5 を培養液に加えることで生存率の低下を抑制でき、細胞毒性の機序として Bax カスケードの関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：神経変性疾患

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症、トランスジェニックマウス、スーパーオキシドディスムターゼ1、脊髄、初代培養、アストロサイト、Bax

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、進行性に筋萎縮・筋脱力を来し、四肢麻痺・呼吸筋麻痺のため3-5年の経過で死にいたる難治性

神経筋疾患である。大脳・脳幹および脊髄の運動ニューロンが選択的に細胞死をおこすが、原因病態が充分には明らかにされておらず、有効な治療法は未だ確立していない。ALS

発症者の5-10%は遺伝性で(FALS)、1993年に細胞質内の活性酸素消去機構であるSOD1遺伝子の点突然変異が一部のFALSの原因遺伝子であることが解明された。ヒトALS患者と同じ遺伝子変異をマウス、ラットに導入することでALSの症状が再現され、これらのALSモデル動物の解析により、運動ニューロンの細胞死における分子病態メカニズム解明は大きな進展を見せている。一方、マウスの運動ニューロンのみに選択的に変異SOD1を発現させてもALSの症状を呈しないこと、正常の運動ニューロンと変異SOD1を導入したアストロサイトを持つキメラマウスの研究から、神経細胞と非神経細胞の相互作用が運動ニューロン死に関わることが分かってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*in vitro*の系を用いてグリア細胞からのシグナルが運動ニューロンに与える影響を明らかにすることである。これまで変異SOD1を導入した様々なモデルから運動ニューロン死のメカニズムが提唱されてきた。主なものはミトコンドリア異常とそれに伴うカスパーカスケードの亢進、神経細胞体あるいは軸索を構成するニューロフィラメントの異常に伴う軸索輸送の障害、グルタミン酸トランスポーターの異常によるグルタミン毒性である。これらに基づいた治療が始まっているが必ずしも成果を上げていない。本研究では①脊髄初代培養で得られた運動ニューロンあるいは胚性幹細胞(ES細胞)から分化誘導した運動ニューロンとアストロサイトの共培養のシステムを確立し、②変異SOD1トランスジェニックマウスで発症前から認められるアストロサイトの増生

が、運動ニューロン死に関与する機序を明らかにし、運動ニューロン死を遅延できる治療法の開発に結びつけることを目的とする。

3. 研究の方法

これまで培養細胞に変異SOD1遺伝子を導入しても研究に適したモデルが確立されていなかった。そこで胚性幹細胞(ES細胞)から分化誘導した運動ニューロン、および正常マウス胚の脊髄から初代培養から得た運動ニューロンを用いた。さらに生後1-2日のALSモデルマウスとコントロールマウスからアストロサイトを初代培養し、上記の運動ニューロンと共培養した。アストロサイト上で培養した運動ニューロンの1週間後、2週間後の生存率を測定した。また運動ニューロンは徐々に軸索を伸長するが、その軸索の長さ、および細胞体の大きさを測定した。続いてこの運動ニューロン死を阻害する薬剤について検討した。ALSモデルマウス脊髄ではアポトーシスに関わるカスパーの活性化が示唆されているためカスパー阻害剤、Bax阻害剤であるV5を投与して生存率を比較した。

4. 研究成果

ES細胞は胚様体を形成させた後、レチノイン酸とゾーニックヘッジホッグを添加し、運動ニューロンに分化させた。11日目マウス胚の脊髄から運動ニューロンを分離し初代培養した。アストロサイトは変異SOD1(G93A)を導入したトランスジェニックマウス(筋萎縮性側索硬化症モデルマウス)およびコントロールマウスの生後1-2日の脊髄を使用し、トリプシン処理後細胞を振とう培養を行い、混入したミクログリアが除去されたアストロサイ

トの初代培養細胞を得た。得られた運動ニューロンをALSモデルおよびコントロールマウスのアストロサイト上で共培養し、アストロサイトが運動ニューロンに及ぼす影響を観察した。

その結果、変異SOD1を発現したアストロサイト上の運動ニューロンは生存率がコントロールと比較して低下しており、また残存した運動ニューロンの細胞体の面積が小さく、伸長した軸索の長さが短いことがわかり、細胞毒性を持つと考えられた。この細胞毒性が液性因子によるものかを明らかにするためにそれぞれのアストロサイトの培養液を集め、その中で運動ニューロンのみを培養したところやはり神経細胞の生存率の低下が認められた。カスパーズ阻害剤はニューロン死を抑制できなかったが、Bax inhibitorであるV5を培養液に加えることで生存率の低下を抑制でき、機序としてBaxの存在が示唆された。原因物質は同定できていないため同定するために変異SOD1発現アストロサイトの共培養からmRNAを抽出しサブトラクション法を用いてコントロールと比較して増減しているcDNAのリストを作成した。

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 5 件)

- (1) Ohta Y, Kamiya T, Nagai M, Abe K (他 8 名、3 番目) . Therapeutic benefits of intrathecal protein therapy in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 2008 Oct;86(13):3028-37 査読有

- (2) Ishigaki A, Aoki M, Nagai M, Itoyama Y (他 5 名、3 番目) . Intrathecal delivery of hepatocyte growth factor from amyotrophic lateral sclerosis onset suppresses disease progression in rat amyotrophic lateral sclerosis model. J Neuropathol Exp Neurol. 2007 Nov; 66(11):1037-44. 査読有
- (3) Morimoto N, Nagai M, Abe K (他 8 名、2 番目) . Increased autophagy in transgenic mice with a G93A mutant SOD1 gene. Brain Res. 2007 Sep 5;1167:112-7. 査読有
- (4) Sasaki S, Nagai M, Iwata M (他 3 名、2 番目) . Motor Neuron Disease in Transgenic Mice With an H46R Mutant SOD1 Gene. J Neuropathol Exp Neurol 2007 66:517-524. 査読有
- (5) Nagai M, Re DB, Nagata T, Chalazonitis A, Jessell TM, Wichterle H, Przedborski S. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. Nature Neurosci. 2007 May; 10(5): 615-622. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) Nagai M Dysfunction of mitochondrial oxidative phosphorylation in ALS rat model. The 23rd International symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2007. 5. 22. 大阪
- (2) 永井真貴子 変異SOD1 遺伝子発現アストロサイトの運動神経細胞死への関与 第 49 回 日本神経学会総会 2008. 5. 15 東

京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 真貴子 (NAGAI MAKIKO)

岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80420488

(1) 研究分担者

なし

(1) 連携研究者

なし