

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591021

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症におけるミクログリアの分子病態の解明

研究課題名（英文） A role of microglia in Amyotrophic Lateral Sclerosis

研究代表者

山中 宏二（YAMANAKA KOJI）

独立行政法人理化学研究所・山中研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：80446533

研究成果の概要：遺伝性筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルである変異 SOD1 マウスの疾患進行期の脊髄病巣のグリア細胞で異常発現している分子を網羅的に解析し、疾患進行期の2種のALSモデルマウスに共通する約200の異常発現遺伝子を同定した。細胞群特異的なトランスクリプトームを用いた解析によりそのうち約70%がミクログリアに主に発現する遺伝子であることが判明した。また、細胞群特異的に変異 SOD1 を除去できるモデルマウスを用いてアストロサイトが ALS の疾患進行を規定する細胞群であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：神経変性疾患、神経病態生化学、筋萎縮性側索硬化症、ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

SOD1変異を有する遺伝性筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者や動物モデルでは、変異蛋白はどの細胞群にもユビキタスに発現しているにもかかわらず、運動ニューロン特異的に変性が起こる。またALS病巣で疾患の発症、進行に伴ってアストロサイトの増殖やミクログリア活性化の病理像が患者、モデルマウスの両方でみられ、グリア細胞がALSの病態に関与している状況証拠が蓄積されてきている。しかし、これらの病理変化が神経変性に随伴し

た二次的変化なのか、あるいは神経変性の過程に直接貢献する一次的な病的変化であるのかは解明されていなかった。

野生型と変異SOD1マウスとのキメラマウスにおいて、野生型細胞が多い環境にある変異SOD1を発現する運動ニューロンは長期生存することが示され、SOD1マウスで起こる運動ニューロン変性は非自律性に起こる、つまり神経変性は神経細胞由来の変異SOD1毒性のみで自律性に起こる訳でなく周囲のグリア細胞などの非神経細胞由来の変異SOD1毒性も必要であることが提唱された。我々は、さ

らに細胞群特異的に変異SOD1を除去することができる新規ALSモデルマウスを用いて、ミクログリアにおける変異SOD1毒性がALSの疾患進行を加速することを見いだした。これらの知見により、ALSの病態解明には運動ニューロンにおける病態のみではなく、グリア細胞における分子病態解明が必要であることが示唆される。

2. 研究の目的

これまでの我々の知見に立脚し、ALSの疾患進行を規定する細胞群であるグリア細胞、とくにミクログリアに起こる病的変化の分子レベルでの解明とそれに基づいた治療法の開発を目的とする。また、モデルマウスを用いた細胞群特異的に変異SOD1を除去する方法により他のグリア細胞のALS病態への関与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 変異SOD1マウス脊髄病巣のグリア細胞における遺伝子発現の網羅的解析

ALS発症期のマウス腰部脊髄を用いて、biological replicate数は3とした。マウス脊髄よりRNAをTRIzol試薬とRNeasy Mini Kitを用いて抽出、A260/280比>1.9と電気泳動にてrRNAの確認を行った。2 μ gのRNAを用いてAffymetrix社のプロトコールに沿って、GeneChip(Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Arrays)へのhybridization, scanningを経て、GeneSpring softwareを用いてデータ解析を行った。SOD1酵素活性のmRNAの発現への影響を除外するため、SOD1活性をもたないG85R変異を発現したSOD1^{G85R}マウスと野生型マウス(C57/Bl6)の比較と、SOD1活性は保たれているG37R変異を発現したSOD1^{G37R}マウスとSOD1^{WT}マウスの比較を行い、両方の比較において共通に変動している遺伝子を抽出した。

次にこれらの遺伝子のmRNAの変動がどの細胞に由来するのかを推定するため、2種類の公開データベース(NIH Neuroscience Microarray Consortium; Gene Expression Omnibus)より運動ニューロン・神経細胞・アストロサイト・オリゴデンドロサイトのmRNA発現データを入手した。また、ミクログリアのmRNA発現プロファイルは、マウス新生仔からの初代培養ミクログリアを用いて作成した。これらの生データを β -actinとGAPDHで補正した値を細胞群別トランスクリプトームとして作成し、変異SOD1マウスから得られた遺伝子群を解析した。

(2) ALSの病態におけるアストロサイトの関与

LoxSOD1^{G37R}マウスとアストロサイト特

異的にCreを発現するGFAP-CreLacZマウスとを交配して、変異SOD1をアストロサイトから特異的に除去することでモデルマウスの発症時期、罹病期間、生存期間、病巣におけるグリア細胞の動態を検討した。

4. 研究成果

(1) 変異SOD1マウス脊髄病巣のグリア細胞における遺伝子発現の網羅的解析

2種の変異SOD1マウスに共通して変動している遺伝子は225個であった。(2倍以上の発現上昇している遺伝子を抽出した)それらについてトランスクリプトームを用いて細胞群別発現量を算出し、その値をもとに主に発現している細胞群別に分類した。その結果、約70%の遺伝子がミクログリアに優位に発現していた。そのリストにはMac2, CD68やIba-1等のミクログリアマーカーに加えて、NADPH oxidaseが含まれていた。NADPH oxidaseは活性酸素を生じ、近年ALSマウスモデルからノックアウトすることにより治療効果が得られることが判明している。また、GFAPやaquaporin4等のマーカーを含む23個の遺伝子がアストロサイトに優位に発現している遺伝子として分類された。

現在、ミクログリア関連遺伝子リストに含まれる遺伝子群の検証を行っているが、補体など自然免疫経路に関与する遺伝子が多く含まれている。今後、有力と考えられる遺伝子について、インビトロの培養系やモデルマウスを用いた検証を進めていく。

(2) ALSの病態におけるアストロサイトの関与

アストロサイト特異的に変異SOD1の発現を抑制したLoxSOD1^{G37R}/GFAP-Creマウスの発症時期は対照群と比較してほとんど変化がみられなかったが、疾患進行を著明に遅延させることでその生存期間を約60日延長した。罹病期間は約2.2倍延長した(未除去群の約39日に対し、除去群では約87日)。

また、LoxSOD1^{G37R}/GFAP-Creマウスの脊髄病巣では、ミクログリアの増殖や活性化が著しく抑制され、Creタンパク質を発現しているアストロサイト(変異型SOD1が除去されて正常化したアストロサイト)が多い環境では、活性化ミクログリアは減少していた。

つまり、ALS進行の規定因子としてミクログリアとアストロサイトが同定され、アストロサイトにおける病的変化がミクログリアの異常活性化を促進しており、これらのグリア細胞がALSの進行を遅延する治療の標的細胞であることが示された。

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 4 件)

① Ilieva H, Yamanaka K, Malkmus S, et al.

(7名中2番目) Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 105: 12599-12604, 2008. 査読有り

② Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, et al.

(8名中1番目) Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice.

Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 105: 7594-7599, 2008. 査読有り

③ Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S,

Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Misawa H, Takahashi R, & Cleveland DW. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis.

Nat. Neurosci., 11: 251-253, 2008. 査読有り

④ 山中 宏二, 山下 博史

ALS とミクログリア: 非細胞自律性の神経細胞死. Brain and Nerve, 59: 1163-1170, 2007. 査読なし

[学会発表] (計 6 件)

① Yamanaka K. Glial cells as central contributors to non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. BMB2008 (第 81 回日本生化学会, 第 31 回日本分子生物学会合同大会) シンポジウム

2008 年 12 月 9 日, 神戸.

② Yamanaka K. Astrocytes and microglia determine disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. Cold Spring Harbor 2008 Meeting on Glia in Health & Disease. 2008 年 7 月 20 日, Cold Spring Harbor, USA.

③ Yamanaka K. Selective gene ablation of mutant SOD1 in mice identifies astrocytes as determinant of disease progression in ALS.

Society for Neuroscience 2007, 2007 年 11 月 5 日, San Diego, USA.

④ Yamanaka K. Selective gene ablation of mutant SOD1 in astrocytes significantly slows disease progression of ALS mice. 18th International Symposium on ALS/MND, 2007 年 12 月 2 日, Toronto, Canada.

⑤ 山中 宏二, 神経変性疾患の動物モデルー筋萎縮性側索硬化症. 第 48 回日本神経学会総会 シンポジウム. 2007 年 5 月 18 日, 名古屋.

⑥ 山中 宏二, 非細胞自律性の神経細胞死. 第 27 回日本医学会総会, 2007 年 4 月 6 日, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 宏二 (YAMANAKA KOJI)

独立行政法人理化学研究所・山中研究ユニット・ユニットリーダー

研究者番号: 80446533

(2) 研究協力者

山下 博史 (YAMASHITA HIROFUMI)

独立行政法人理化学研究所・山中研究ユニット・研究員

研究者番号: 60402913

藤森 典子 (FUJIMORI NORIKO)

独立行政法人理化学研究所・山中研究ユニット・テクニカルスタッフ