

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790612

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介在性の炎症機転の解析

研究課題名（英文）

Analysis of microglia associated inflammation in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

立石 貴久 (TAKAHISA TATEISHI)

九州大学大学院医学研究院神経内科学 助教

研究者番号：50423546

研究成果の概要：

1. ALS に対するミクログリア関連炎症機転の解析と治療法の開発

私たちは、蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリー法 (fluorescent bead-based immunoassay) により、比較的進行の遅い脊髄性進行性筋萎縮症と ALS 患者髄液中サイトカインを測定比較し、MCP-1、G-CSF に加えて、ALS では OND や SPMA より髄液中の IL-1 β 、IL-8、IL-9、IL-17、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、eotaxin、macrophage inflammatory protein-1 β 、interferon- γ -inducible protein-10 などの炎症性サイトカインおよび VEGF が有意に上昇していることを見出した。髄液中 MCP-1 の上昇は ALS の臨床的重症度の悪化 (ALS FRS の低下)、髄液蛋白値と正の相関を示し、炎症機転 (glial inflammation) の運動ニューロン障害への寄与が考えられた (投稿準備中)。髄液 VEGF 値は IL-1 β や TNF- α と正の相関を示したことから、その上昇には glial inflammation の関与が示唆された。私たちは ALS 患者の脊髄前角細胞における、VEGF、VEGF 受容体、VEGF 転写因子である HIF-1 α の発現を免疫組織化学的に検討した。ALS では非神経疾患患者と比較して、脊髄前角細胞において VEGF および VEGF 受容体の発現が低下する一方で、HIF-1 α の発現は細胞質では亢進していたが、核内ではむしろ発現が低下していた。これに対して、アストロサイトでは VEGF の発現が亢進しており、髄液中での VEGF の上昇はアストロサイト由来していると考えられた。他方、mSOD1 遺伝子導入マウスでは HIF-1 α の核内移行は保たれていた。したがって、ヒトの孤発性 ALS の発症機序には、VEGF とその受容体の運動ニューロンにおける発現低下が関与し、発現低下のメカニズムとして、運動ニューロン内の HIF-1 α の核内移行の障害が寄与していると考えた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

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：脳神経疾患、神経化学、神経病理学、筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は、神経難病の中でも最も悲惨な病気であり、全身の運動ニューロンが障害され呼吸不全により死にいたる。その原因は明らかにされておらず、有効な治療法も無いため ALS 患者の医療環境の厳しさは大きな社会問題となっている。ALS の病因仮説の中で、近年、神経細胞死に関わるグリア細胞環境の異常が注目されてきている。中でもミクログリアによる神経細胞傷害に関しては、アルツハイマー病を代表として多くの神経変性疾患の促進因子と考えられている。ミクログリアは、NO や TNF α などの炎症性サイトカインを産生することで、神経細胞傷害に寄与している。

申請者らは、これまで多発性硬化症を中心とする神経免疫疾患の病態解明と治療法の開発に努めてきた。なかでも、新たに開発された fluorescent bead-based immunoassay 法を用いて、これまで不可能であった微量の髄液サイトカイン/ケモカインの多項目同時測定に成功し、視神経脊髄型多発性硬化症患者 (OS-MS) の髄液中 IL-17/IL-8 系の上昇を発見し、OS-MS の病態における好中球系の関与の重要性を報告している (Ishizu et al. Brain 2005)。

2. 研究の目的

神経疾患におけるミクログリアの働きとしては、その防御機転や傷害機転の両方の側面が報告されている。本研究で着目している MCP-1 は、神経細胞やグリア細胞から放出され、NMDA による神経傷害時 (Galasso et al. Exp Neurol 2000) やグリオーマにおけるミクログリアの誘導に関与することが報告されている (Platten et al. Ann Neurol 2003)。ALS に関しても、血中および髄液中での MCP-1 の上昇やグリア細胞での有意な発現が報告されている (Henkel et al. Ann Neurol 2004)。申請者は、MCP-1 の運動ニューロンに対する生物学的作用を運動ニューロンの培養細胞系で検証しているが、現在のところその直接作用は確認されていない。これまで、MCP-1 は、ミクログリアを介して神経細胞に傷害を与えることやアストロサイトにおいて発現しているとの報告がある。そこで本研究では、

(1) グリア-神経細胞間の相互作用を解析し、グリア細胞、中でもミクログリアを介した MCP-1 による神経傷害を明らかにする。さらに (2) ミクログリア遊走因子である MCP-1 に対する変異型 MCP-1 ドミナントネガティブベクターを ALS モデルマウスに投与すること

でその生存効果を解析し、治療へのアプローチを試みる。さらに、(3) 外来性のミクログリアが神経防御的に働くことが報告されていることより、ALS 動物モデルに対し、正常培養ミクログリアを投与しその生存効果を解析する。申請者らは、本研究を通して、ALS の病因への関与が考えられている活性型ミクログリアを調節することによって ALS の治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

我々は ALS の免疫・炎症機転に着目し、比較的運動ニューロンの変性の遅い脊髄性進行性筋萎縮症 (spinal progressive muscular atrophy, SPMA) と ALS 患者中髄液サイトカインの変動の解析を進めた。対象は孤発性 ALS 患者 42 人 (男性 20 名、女性 22 名、平均年齢 56.7 \pm 13.2 歳)、孤発性 SPMA 患者 12 人 (男性 6 名、女性 6 名)、および、非炎症性神経疾患患者群 (Other non-inflammatory neurological disease, OND) 34 名の脳脊髄液を採取し、fluorescent bead-based immunoassay 法を用いて IL-1 β 、IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-17、TNF- α 、interferon (IFN)- γ 、MCP-1、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11、CXCL8、CXCL10、G-CSF、GM-CSF、bFGF、platelet-derived growth factor-bb (PDGFbb)、および VEGF の計 27 種類のサイトカイン、ケモカインの測定を行った。サイトカイン、ケモカインの測定結果を検討するとともに、髄液蛋白、ALS の重症度 (functional rating scale, FRS)、進行の速さ (disease progression rate) との相関関係について検討した。

また、そのうち VEGF と hypoxia inducible factor (HIF)-1 α について検討するために、ALS 6 例、対象群 6 例の剖検脊髄、および生後 12、16、18 週の SOD1^{G93A} トランスジェニックマウス脊髄における、VEGF、VEGF 受容体 1、2、HIF-1 α の発現を解析した。

4. 研究成果

その結果、ALS 患者群では OND や SPMA 群と比較して、髄液中の MCP-1、G-CSF に加えて eotaxin、macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β)、eotaxin、interferon-inducible T-cell α chemoattractant (IP-10)、tumor necrosis factor- α (TNF- α)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、IL-8、IL-9、IL-17

が有意に上昇している事を見出した。

ALS の重症度が高い程 MCP-1 も高い傾向がみられ、MCP-1 による運動神経細胞に対する傷害機転が考えられた。MIP-1β は MCP-1 とは臨床重症度、症状進行の速度などに関して逆相関を示しており、TNF-α、IL-1β などの pro-inflammatory cytokine による p38 MAPK 経路の活性化を介した神経細胞の傷害に対して、MIP-1β は Akt 依存性のシグナル経路を活性化することにより神経保護作用を示すと考えている。

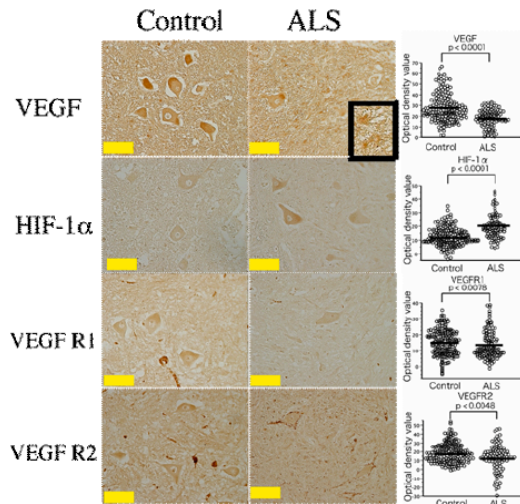


図1 ALS患者脊髄前角細胞における HIF-1α、VEGF、VEGFレセプターの発現

ALS 患者の脊髄前角細胞における、VEGF、VEGF 受容体、VEGF 転写因子である Hypoxia inducible factor-1α (HIF-1α) の発現を解析した。ALS 患者群においてコントロール群及び VEGF 受容体の発現が低下、HIF-1α の発現亢進を認めた (図 1) ALS の発症機序には虚血性機転の存在していることが考えられ、また運動神経細胞内において HIF-1α の発現から VEGF の転写に至る経路の阻害が存在するものと考えられた。

また、ALS のモデルマウスである mSOD1 遺伝子導入マウスにおいて、脊髄前角細胞にお

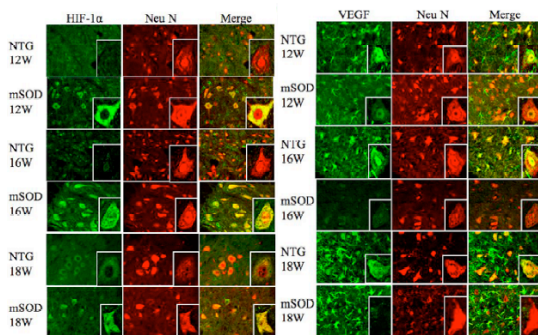


図2 mSOD1遺伝子導入ALSモデルマウスの脊髄前角運動ニューロンにおける HIF-1α および VEGF の発現

ける VEGF と HIF-1α の発現を解析した。ALS 患者脊髄と同様に前角細胞において発症直前の 12 週から HIF-1α の発現が亢進し、VEGF の細胞内での発現が低下していることが示された。(図 2) しかし mSOD1 マウスでは核内においては HIF-1α の染色性が保たれている点が ALS 患者脊髄の場合と異なっており、ALS 患者と mSOD1 マウスにおいて HIF-1α の核移行に差が存在すると考えている。

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 8 件)

1. Shi N, Kawano Y, Tateishi T, Kikuchi H, Osoegawa M, Ohyagi Y, et al. Increased IL-13-producing T cells in ALS: positive correlations with disease severity and progression rate. *J Neuroimmunol.* 2007;182:232-5.
2. Kawajiri M, Mogi M, Higaki N, Tateishi T, Ohyagi Y, Horiuchi M, et al. Reduced angiotensin II levels in the cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2008;119:341-4.
3. Tanaka M, Matsushita T, Tateishi T, Ochi H, Kawano Y, Mei FJ, et al. Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology.* 2008;71:974-81.
4. Ueda M, Kawamura N, Tateishi T, Sakae N, Motomura K, Ohyagi Y, et al. Phenotypic spectrum of hereditary neuralgic amyotrophy caused by the SEPT9R88W mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009.
5. Ikezoe K, Furuya H, Arahata H, Nakagawa M, Tateishi T, Fujii N, et al. Amyloid-beta accumulation caused by chloroquine injections precedes ER stress and autophagosome formation in rat skeletal muscle. *Acta Neuropathol.* 2009;117:575-82.
6. 古賀優子, 磯部紀子, 立石貴久, 小副川学, 大八木保政, 吉良潤一. 基礎疾患なく雷鳴頭痛と posterior reversible encephalopathy syndrome (PRES) を発症し、経過中可逆性の脳血管攣縮をみとめた一例. *臨床神経.* 2008;48:355-8.
7. 稲森真人, 土井光, 立石貴久, 松岡健, 岩城徹, 吉良潤一. 側頭部有痛性索状腫瘍を呈し側頭動脈炎との鑑別を要した孤発性神経線維腫の 1 例. *臨床神経.* 2009;49:27-31.
8. 立石貴久, 岩木三保, 吉良潤一. 福岡県

重症神経難病ネットワークの現状と課題.
福岡医学雑誌. 2008;99:203-8.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 立石貴久、田中正人、山崎亮、菊池仁志、大八木保政、吉良潤一、mSOD1 G93A マウスにおけるVRGFとHIF-1 α の発現の解析. 日本神経学会総会 横浜. 2008.
2. 荒畑創, 田中正人, 立石貴久, 磯部紀子, 本村今日子, 大八木保政, et al. mdx マウスにおけるサイトカイン・ケモカインの動態解析と分子標的療法の開発. 日本神経学会総会 横浜. 2008.
3. 田中正人, 立石貴久, 松下拓也, 越智博文, 吉良潤一. 脊髄炎症性疾患のサイトカインプロフィール. 日本神経学会総会 横浜. 2008.
4. 山崎亮, 田中正人, 立石貴久, 菊池仁志, 吉良潤一. 変異SOD1-Tg マウスにおける神経細胞脆弱性とミクログリア機能障害. 日本神経学会総会 横浜. 2008.
5. Tateishi T, Tanaka M, Kikuchi H, Yamasaki R, Kira J. Cytokine/chemokine profile in the cerebrospinal fluid from patients with motor neuron disease. 59th Annual Meeting of the American Academy of Neurology Boston. 2007.
6. 立石貴久、田中正人、山崎亮、菊池仁志、吉良潤一：運動ニューロン疾患患者髄液のサイトカイン/ケモカインの網羅的解析. 日本神経免疫学会 2007. 金澤.
7. 立石貴久、田中正人、山崎亮、菊池仁志、吉良潤一：運動ニューロン症患者のサイトカイン/ケモカインの網羅的解析. 日本神経学会総会 2007. 名古屋.
8. 立石貴久、岩木三保、関本聖子、武藤香織、成田有吾、吉良潤一：難病医療専門員のための医療相談マニュアル作成の試み. 日本神経治療学会 2007. 仙台.
9. 河野祐治、田中正人、立石貴久、史楠、小副川学、越智博文、吉良潤一：アトビー性脊髄炎と若年性一側上肢筋萎縮症での髄液サイトカインプロフィール. 第19回日本神経免疫学会 2007. 金澤.
10. 河野祐治、田中正人、松岡健、立石貴久、吉良潤一：若年性一側上肢筋萎縮症での髄液中サイトカイン/ケモカインの網羅的検討. 日本神経学会総会 2007. 名古屋.
11. 山崎亮、田中正人、立石貴久、菊池仁志、大八木保政、吉良潤一：変異SOD1-Tg マウスにおける神経細胞の脆弱性と単球系細胞機能障害. 第19回日本神経免疫学会総会 2007. 金沢.
12. 山崎亮、田中正人、立石貴久、越智博文、大八木保政、吉良潤一：筋萎縮性側索硬化症(ALS)における単球系細胞の組織浸潤能低下. 第48回日本神経学会総会 2007. 名古屋.

〔図書〕(計 5 件)

1. 岩木三保, 立石貴久, 吉良潤一：第3章 入転院紹介以外の相談への対応. 難病医療専門員による難病患者のための難病相談ガイドブック 九州大学出版会 2008
2. 立石貴久, 吉良潤一：第9章 ネットワークの拡充. 難病医療専門員による難病患者のための難病相談ガイドブック 九州大学出版会 2008
3. 岩木三保, 立石貴久, 吉良潤一：第3章 入転院紹介以外の相談への対応. 難病医療専門員による難病患者のための難病相談ガイドブック 九州大学出版会 2008
4. 岩木三保, 立石貴久, 吉良潤一：第11章 事例紹介. 難病医療専門員による難病患者のための難病相談ガイドブック 九州大学出版会 2008
5. 岩木三保, 立石貴久、成田有吾、菊池仁志、吉良潤一：神経難病の医療相談マニュアル～難病医療専門員の医療相談マニュアルの作成に向けて～. 神経難病のすべて～症状・診断から最先端治療、福祉の実際まで 新興医学出版 2007.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石貴久 (TAKAHISA TATEISHI)

研究者番号：50423546

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし