

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07128

研究課題名(和文) 神経変性疾患における毒性タンパク質の細胞間伝播とグリアリンパ系の関与

研究課題名(英文) Involvement of glymphatic system in removing brain waste products in neurodegenerative diseases.

研究代表者

三澤 日出巳 (Misawa, Hidemi)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：80219617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ALSの原因である変異型SOD1を発現させたトランスジェニックマウスでは、運動神経に毒性SOD1分子種が蓄積し、運動神経が進行性に死滅する。近年、脳からの代謝物・老廃物の新たな排泄機構としてグリアリンパ系が注目されている。本研究では、脊髄内に毒性SOD1を微量注入し、そのクリアランスをウエスタンブロット法で評価したところ、野生型マウスに比べAQP4欠損マウスでは排泄遅延が起こることが示された。また、ALSマウスではAQP4の顕著な発現上昇と局在異常が観察され、脳実質でのタンパク質の排出遅延が示された。以上から、ALSマウスのグリアリンパ系では、一方向性の流れの障害と淀みの発生が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの動物モデルであるSOD1G93Aマウスにおいて、AQP4による水輸送を駆動力とする老廃物排泄機構(=グリアリンパ系)の異常が示された。この異常はAQP4の発現上昇と局在の乱れを特徴とし、AQP4欠損マウス(AQP4が存在しないこと)で観察されるグリアリンパ流の低下とは、別の病態機序であることが判明した。異常タンパク質の脳内蓄積のメカニズムとして、渇水による水流不足と、洪水による淀みの発生の2つがあることを解明した本研究は、今後の創薬戦略に有用な知見を提供するものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Overexpression and mislocalization of aquaporin-4 (AQP4) in the SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) have previously been reported. However, how alterations of AQP4 affect interstitial bulk flow in the brain and spinal cord, the so-called glymphatic system, is unclear. In this study, we found an enhanced accumulation of disease-associated SOD1 species in SOD1G93A;AQP4^{-/-} mice compared with SOD1G93A mice. By directly injecting SOD1 oligomers into the spinal cord parenchyma, we observed a significantly delay in clearance of biotinylated or fluorescent-labeled SOD1 oligomers in AQP4^{-/-} mice than in wild-type mice. Furthermore, when we injected the fluorescent-labeled tracer protein into the cisterna magna and analyzed the tracer distribution in the spinal cord, approximately 35% processing ability was reduced in SOD1G93A mice compared to wild-type mice. These results suggest that the glymphatic system is abnormal in SOD1G93A mice.

研究分野：神経薬理学、病態神経科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 凝集体 グリアリンパ系

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の特徴の1つとして、細胞内外での毒性タンパク質(原因タンパク質)の凝集体形成と蓄積が知られている。細胞は外液(組織間質液)から酸素や栄養分を受け取り、不要な代謝物やタンパク質などを外液に放出して生命活動を維持している。全身では細胞外液の供給・排泄は血管系とリンパ系の2つの経路によって行われている。特にリンパ系は、細網内皮系が発達して細菌や毒素タンパク質の排除にも重要な役割を担っている。ところが、「脳にはリンパ系がない」というのが長年の定説であり、脳における細胞外液の循環経路には不明な点が多く残されている。2013年にNedergaardらによって、脳における新たな細胞外液の供給・排泄経路が発見され、Glymphatic System (GliaとLymphの造語: グリアリンパ系)と名付けられた。グリアリンパ系では、血管周囲腔(perivascular space)を流れる脳脊髄液(CSF)がアストロサイト足突起に局在する水チャネルのアクアポリン4(AQP4)を介して脳実質に流入・流出することにより、細胞外液の一方方向の流れ(グリアリンパ流)を作るとされている。グリアリンパ流は、タンパク質等の老廃物の処理に重要であり、睡眠によって活性化され、老化によって不活性化されることから、神経変性疾患や脳老化との関連が注目されている。

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位及び下位運動神経が選択的に死滅していく進行性の神経変性疾患である。四肢の麻痺や球麻痺(嚥下や発声の異常)を初期症状とし、やがて呼吸筋が麻痺して死に至る。我が国における承認薬は、リルゾールとラジカットのみであり、かつその治療効果は限定的である。患者のうち9割は孤発性、1割は家族性で、家族性のうち2割でスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)の変異が検出される。変異ヒトSOD1を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、運動神経の変性・脱落、四肢の筋萎縮やそれに伴う体重減少など、ALSの病態をよく再現し、ALSの動物モデルとして広く使用されている。

SOD1は抗酸化酵素であり、活性酸素の一種であるスーパーオキシドアニオンを酸素と過酸化水素に不均化する。SOD1欠損マウスではALS様症状を発症しないことから、酵素活性とALS発症とは無関係であり、変異したSOD1が運動神経に対する何らかの毒性を獲得することが発症に繋がると考えられている。野性型SOD1は、2量体を形成して亜鉛と銅を配位することで、極めて安定な構造を取っている。一方で我々は、変異SOD1で金属配位が外れると、体温(37°C)付近でその2量体の立体構造が変化するミスフォールディングが起こりやすくなることを示している。このミスフォールディングが起こると、分子内のジスルフィド結合のシャッフルや、分子間でのジスルフィド結合が形成され、SOD1オリゴマーと呼ばれる多量体構造を形成する。このミスフォールドSOD1やSOD1オリゴマーなどの異常構造タンパク質は運動神経細胞やその周期に蓄積し、神経細胞死を引き起こす毒性をもち、これがALS病態に関与すると考えられている。

2. 研究の目的

我々は、血管病の観点からALSについて研究し、血液脳関門(BBB)の構成要素であるアストロサイト足突起とそこに局在化するAQP4に着目してきた。これまでに、SOD1^{G93A}マウスのAQP4を欠損させると、発症時期の早期化、生存期間の短縮、運動機能の低下という病態進行の加速・悪化が起こること、SOD1^{G93A}マウスの主病変部位(脊髄)では病態進行に伴ったAQP4発現上昇・局在異常が見られることを見出していた。通常、アストロサイト足突起に局在し、血管周囲のみ分布するAQP4が、ALSの病態進行に伴ってアストロサイト足突起以外の部分、つまり、血管周囲以外の部分にも分布が見られるようになることを発見した。また、遺伝性および孤発性ALS患者の剖検脊髄標本においても、AQP4の発現上昇・局在異常が見られることを確認した。これらの知見をベースに、本研究では、ALSの病態進行へのグリアリンパ系の関与を明らかにすることを目的として実験を行った。SOD1関連異常タンパク質の病変部位からの排泄にグリアリンパ系が関与すること、ALSマウスにおいてグリアリンパ系の異常を示すことで、ALS新規治療薬の開発へ新たな視点を提供することを目標とした。

3. 研究の方法

マウス組織中に含まれる疾患特異的な異常構造タンパク質の定量はサンドウィッチELISA法により行った。主病変部位(脊髄)からのタンパク質排泄能評価には、脊髄実質内にタンパク質溶液を微量投与する方法(脊髄内投与法)を用いた。投与後一定時間で、投与部位周辺の組織を採取し、ウエスタンブロッティング法により組織内の残存量を定量して排泄能の指標とした。ALSマウスにおけるグリアリンパ系の異常の有無については、上記の脊髄内投与法、およびCSF内に直接蛍光標識トレーサータンパク質溶液を投与する方法(大槽内投与法)の2つの方法により判定した。トレーサータンパク質としては蛍光標識ovalbumin(OVA)を用いた。蛍光OVA投与一定時間後に4%PFAによる灌流固定を行い、凍結組織切片を作製した。免疫組織染色は、free-float切片を用い、蛍光免疫染色法により免疫陽性シグナルを可視化した。脊髄の血管周囲マクロファージ(perivascular macrophage: PVM)を枯渇させる目的で、クロドロン酸リポソームを大槽内に投与した。コントロール群には、中身が空のコントロールリポソームを投与した。PVM枯渇によるタンパク質排泄能への影響は、蛍光標識OVAを脊髄内に投与し、投与部位周辺の連続切片の蛍光輝度値を測定することにより評価した。

4. 研究成果

(1) ALS モデルマウスの病態進行におけるグリアリンパ系の関与

SOD1^{G93A} マウスの主病変部位（脊髄）では、疾患特異的異常タンパク質であるミスフォールド型 SOD1 および SOD1 オリゴマーの蓄積増加が観察された。一方で、これらの異常タンパク質は非病変部位である小脳では検出されなかった。次に、SOD1^{G93A} マウスから AQP4 を欠損させると、病変部位における異常タンパク質の蓄積はすべての病態期を通して亢進していた。一方で、マウス正常 SOD1 を含む総 SOD1 量は、病態進行による蓄積増加も、AQP4 欠損による蓄積亢進も見られなかった。次に、AQP4 欠損マウスを用いて、疾患特異的異常タンパク質である SOD1 オリゴマーがグリアリンパ系を介して排泄されるかを調べた。脊髄内に投与した微量の SOD1 オリゴマーの排泄速度は AQP4 欠損により低下することがわかった。特に、SOD1 オリゴマー投与 3 時間後における差は顕著で、AQP4 欠損による排泄量は 61%低下していた。

次に、SOD1^{G93A} マウスにおけるグリアリンパ系の状態を調べた。蛍光標識 OVA を大槽内投与法により CSF 中に投与し、脊髄への流入・流出を観察することにより、グリアリンパ系の状態を調べた。SOD1^{G93A} マウスでは脊髄内 OVA 存在量の増加が認められた。大槽内投与後の脊髄内 OVA 存在量を経時的に測定したところ、WT マウスに比べて SOD1^{G93A} マウスでは、投与後 0.5 時間から 16 時間の間に脊髄内に残存する OVA の総量が多くなっていることがわかった。さらに、OVA を脊髄内投与してその排泄速度を調べたところ、SOD1^{G93A} マウスでは WT マウスと比べて OVA の排泄が有意に遅延していることが示された。

(2) グリアリンパ系による排泄系と血管周囲マクロファージによる排泄系との関係

大槽内投与法により、SOD1^{G93A} マウスと WT マウスのグリアリンパ系を比較したところ、外来タンパク質の排泄速度は初期（8 時間まで）と後期（8-16 時間）で異なる可能性が示唆された。初期と後期における外来タンパク質の動態を組織化学染色により詳細に検討したところ、後期において大きな違いが観察された。外来タンパク質が何らかの細胞に取り込まれて蓄積・処理されることを示す組織像が観察され、その数は WT マウスに比べて SOD1^{G93A} マウスで有意に増加していた。この外来タンパク質を取り込んでいる細胞の種類を免疫組織染色により検討したところ、血管周囲マクロファージ (perivascular macrophage: PVM) であることが判明した。

PVM とグリアリンパ系との関係性を調べるため、PVM 枯渇によるタンパク質排泄能の変化を調べた。外来タンパク質を脊髄内投与したとき、初期には排泄能に違いが見られなかったが、後期では PVM 枯渇群と非枯渇群で排泄能に違いが見られた。この結果から、PVM 枯渇により外来タンパク質の排泄能が低下することがわかった。

5. まとめ

ALS の動物モデルである SOD1^{G93A} マウスにおいて、AQP4 による水輸送を駆動力とする老廃物排泄機構 (=グリアリンパ系) の異常が示された。この異常は AQP4 の発現上昇と局在の乱れを特徴とし、AQP4 欠損マウスで観察されるグリアリンパ流の低下とは、別の機序であることが判明した (図 1)。また、SOD1^{G93A} マウスにおけるタンパク質排泄能異常を解析する過程で、グリアリンパ系によるタンパク質排泄と PVM によるタンパク質排泄は、協働して老廃物排泄に関与していることが示唆された。以上から、ALS 病態におけるタンパク質排泄機構・タンパク質動態について新たな知見が得られた。

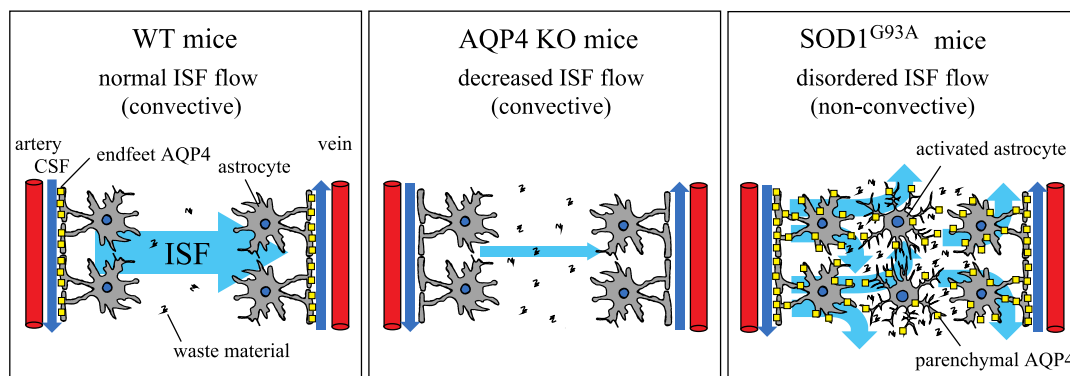


図 1 本研究で明らかとなった SOD1^{G93A} マウスでのグリアリンパ流の異常

正常マウスでは、動脈周囲腔の脳脊髄液 (CSF) は一方向性の流れ (convective flow) として脳実質に流れ込み、組織間質液 (ISF) となって静脈周囲腔に向かう (グリアリンパ流)。この駆動力となるのがアストロサイト足突起に局在する AQP4 であり、グリアリンパ流により脳内の毒性タンパク質などの老廃物が洗い流されると考えられている。AQP4 欠損マウスでは、グリアリンパ流の駆動力が低下して、老廃物の処理が遅延する (渇水状態)。一方で、SOD1^{G93A} マウスでは、アストロサイトの AQP4 発現上昇と局在異常により、グリアリンパ流の乱れが生じ、老廃物の処理が遅延する (洪水状態)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

| | |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名 Moriwaki Yasuhiro, Kubo Natsuki, Watanabe Mizuho, Asano Shinsuke, Shinoda Tomoki, Sugino Taro, Ichikawa Daiju, Tsuji Shoutaro, Kato Fusao, Misawa Hidemi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Endogenous neurotoxin-like protein Ly6H inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor currents at the plasma membrane | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 11996 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-68947-7 | 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 Abe Yoichiro, Ikegawa Natsumi, Yoshida Keitaro, Muramatsu Kyosuke, Hattori Satoko, Kawai Kenji, Murakami Minetaka, Tanaka Takumi, Goda Wakami, Goto Motohito, Yamamoto Taichi, Hashimoto Tadafumi, Yamada Kaoru, Shibata Terumasa, Misawa Hidemi, et al. | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Behavioral and electrophysiological evidence for a neuroprotective role of aquaporin-4 in the 5xFAD transgenic mice model | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications | 6. 最初と最後の頁 67 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-020-00936-3 | 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 Mashimo Masato, Fujii Takeshi, Ono Shiro, Moriwaki Yasuhiro, Misawa Hidemi, Kawashima Koichiro | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Minireview: Divergent roles of 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed on antigen-presenting cells and CD4+ T cells in the regulation of T cell differentiation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Immunopharmacology | 6. 最初と最後の頁 106306 ~ 106306 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2020.106306 | 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 Anzai Itsuki, Tokuda Eiichi, Handa Sumika, Misawa Hidemi, Akiyama Shuji, Furukawa Yoshiaki | 4. 巻 147 |
| 2. 論文標題 Oxidative misfolding of Cu/Zn-superoxide dismutase triggered by non-canonical intramolecular disulfide formation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine | 6. 最初と最後の頁 187 ~ 199 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.017 | 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 Mashimo Masato, Komori Masayo, Matsui Yuriko Y., Murase Mami X., Fujii Takeshi, Takeshima Shiori, Okuyama Hiromi, Ono Shiro, Moriwaki Yasuhiro, Misawa Hidemi, Kawashima Koichiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Distinct Roles of 7 nAChRs in Antigen-Presenting Cells and CD4+ T Cells in the Regulation of T Cell Differentiation | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 1102 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01102 | 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 Hirose Mikako, Asano Mito, Watanabe-Matsumoto Saori, Yamanaka Koji, Abe Yoichiro, Yasui Masato, Tokuda Eiichi, Furukawa Yoshiaki, Misawa Hidemi | 4. 巻 171 |
| 2. 論文標題 Stagnation of glymphatic interstitial fluid flow and delay in waste clearance in the SOD1-G93A mouse model of ALS | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Neuroscience Research | 6. 最初と最後の頁 74 ~ 82 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.10.006 | 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 Okuda Takashi, Nomura Yuki, Konishi Asami, Misawa Hidemi | 4. 巻 898 |
| 2. 論文標題 Competitive inhibition of the high-affinity choline transporter by tetrahydropyrimidine anthelmintics | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology | 6. 最初と最後の頁 173986 ~ 173986 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2021.173986 | 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 Yamamotoya Takeshi, Hasei Shun, Akasaka Yasuyuki, Ohata Yukino, Nakatsu Yusuke, Kanna Machi, Fujishiro Midori, Sakoda Hideyuki, Ono Hiraku, Kushiyama Akifumi, Misawa Hidemi, Asano Tomoichiro | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Involvement of neuronal and muscular Trk-fused gene (TFG) defects in the development of neurodegenerative diseases | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1966 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05884-7 | 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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 廣瀬美嘉子, 麻野珠都, 松本さおり, 山中宏二, 阿部陽一郎, 安井正人, 徳田栄一, 古川良明, 三澤日出巳. |
| 2. 発表標題 SOD1-ALSモデルマウスにおけるグリアリンパ系の破綻と老廃物排泄遅延. |
| 3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 金守悠希, 森脇康博, 三澤日出巳, 今井浩三, 辻祥太郎. |
| 2. 発表標題 抗中皮腫活性を示す二重特異性抗体の開発. |
| 3. 学会等名 第40回日本分子腫瘍マーカー研究会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 廣瀬美嘉子, 麻野珠都, 設楽周生, 阿部陽一郎, 安井正人, 徳田栄一, 古川良明, 三澤日出巳. |
| 2. 発表標題 ALSの病態進行におけるグリアリンパ系の関与 |
| 3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kamishima K, Koyama T, Ohgaki L, yamanaka K, Itohara S, Ogihara N, Sawano S, Mizunoya W, Misawa H |
| 2. 発表標題 Postnatal selective elimination of slow-type motor neurons induces late-onset neuromuscular defects in mice: red muscle atrophy, posture abnormality and kinetic tremor |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 浅野慎介, 森脇康博, 渡邊みずほ, 久保那月, 加藤総夫, 三澤日出巳. |
| 2. 発表標題 アルファ-7型ニコチン受容体に対する新たな内在性修飾因子Ly6Hの作用機構: GPIアンカーの必要性 |
| 3. 学会等名 第140回日本薬理学会関東部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 安達一貴, 廣瀬美嘉子, 麻野珠都, 三澤日出巳. |
| 2. 発表標題 ALSモデルマウスにおけるグリアリンパ系と老廃物排泄異常の解析 |
| 3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 安達一貴, 廣瀬美嘉子, 麻野珠都, 阿部陽一郎, 安井正人, 三澤日出巳. |
| 2. 発表標題 ALSモデルマウスにおけるアクアポリン4を介した脳内の老廃物排泄機構の異常 |
| 3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|