

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07967

研究課題名(和文)モデルマウスを用いた孤発性筋萎縮性側索硬化症の上位運動ニューロン障害の原因解明

研究課題名(英文) Exploration of pathogenesis for upper motor neuron dysfunction of sporadic ALS employing sporadic ALS model mice

研究代表者

日出山 拓人 (Hideyama, Takuto)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：30511456

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)：私たちは、孤発性ALSの剖検組織の検討からグルタミン酸受容体サブユニットであるGluA2のRNA編集異常が疾患特異的に生じていることを明らかにした。さらに、この分子異常が下位運動ニューロンの脊髄運動ニューロン死の直接原因になることをコンディショナルノックアウトマウス(AR2マウス)の動物実験から明らかにし、孤発性ALSのモデル動物を確立した。これらをもとに、RNA編集異常が上位運動ニューロンを含む大脳の神経細胞死の原因となっているのかとどうか、上述した疾患モデルマウスを用いて検討した。その結果、上位運動ニューロンでも下位運動ニューロンの脊髄と同様の神経細胞死が生じていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、孤発性ALS同様にTDP-43病理が、AR2マウスの大脳皮質の神経細胞において神経変性と共に認められた。AR2マウスは上位運動ニューロン障害の検討においても孤発性ALSのモデルとして有用と考えられ、これまでの成果と合わせると孤発性ALSにおいて上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの変性が同様の経路を介して生じている可能性が高いと考えられた。AR2マウスを利用し、ペランパネルの有用性が得られ、さらに有効かつ安全性の高い薬剤、遺伝子治療をはじめとした治療法の開発が進められている。今後も本研究の継続で変性疾患の病因解明と発症メカニズムに基づいた分子標的治療法の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：ALS is a common neurodegenerative disease of unknown etiology of upper motor neurons (UMNs) dysfunction. ADAR2 mediated RNA editing of GluA2 mRNA at the Q/R site was commonly deficient in the LMNs of ALS. We have developed genetically modified mice (AR2 mice) in that the ADAR2 gene is selectively knocked out in cholinergic neurons. AR2 mice indicated progressive loss of LMNs. However, the changes of UMNs in AR2 mice is unknown. We investigated whether similar degeneration is observed in UMNs of AR2 mice. We compared the number of pathological TDP-43 and the morphology of large neurons in primary (M1) and secondary motor cortex (M2) of AR2 mice with age-matched wild-type mice. TDP-43 pathology in AR2 mice is observed with lacking ADAR2 immunoreactivity. The number of large neurons with TDP-43 pathology was significant increased both in M1 and M2 of AR2 mice. These results indicate that deficient ADAR2 activity is likely involved in TDP-43 pathology of UMNs of AR2 mice.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ALS RNA編集 GluA2 ADAR2 上位運動ニューロン TDP-43 ノックアウトマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, 以下 ALS) は、ALS の約 9 割を占め、病因が不明で、特異的な治療法も無く、発症後約 3 年で呼吸筋麻痺により死に至る神経変性疾患で治療法が切望されている疾患である。孤発性 ALS の原因にはグルタミン酸受容体サブタイプである AMPA (2,3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) 受容体 (以下、AMPA) を介した神経細胞死のメカニズムが働く知見が多く報告されており、特に運動ニューロンは AMPA を介する神経細胞死に脆弱である。AMPA の Ca^{2+} 透過性は編集型 GluA2 (GluR2) サブユニットが AMPA に含まれるかどうかにより決まり、GluA2 を 1 個以上含む AMPA は Ca^{2+} 非透過性だが、GluA2 を含む AMPA であっても GluA2 に転写後に生ずべき Q/R 部位の RNA 編集を受けない未編集型 GluA2 を含む AMPA は Ca^{2+} 透過性であり、神経細胞死に関連する。

孤発性 ALS の運動ニューロンでは、GluA2 Q/R 部位に RNA 編集が起こらない未編集型の GluR2 増加が生じることで Ca^{2+} 透過性が亢進し、神経細胞死が生じるという仮説を立てた。

疾患特異性の検討として、少数例で確認後 (Kawahara Y et al Nature, 2004)、約 30 例の孤発性 ALS の剖検例での検討で、古典型、進行性球麻痺型 (PBP)、ALS 痴呆、好塩基性封入体が出現する若年発症例のように臨床像の異なる ALS でも GluA2 Q/R 部位の未編集型が増えており、正常例、他の変性疾患である多系統萎縮症では認めないことから孤発性 ALS では共通の分子変化であることを明らかにした (Hideyama T et al Neurobiol Dis., 2012)。さらに、孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンの GluA2 mRNA の発現量は対照 (正常例、多系統萎縮症) と不変であり、孤発性 ALS では、未編集型 GluA2 を含む AMPA 割合が増加することが運動ニューロン死の病因に深く関連する分子変化であると考えられた。この分子変化が AMPA チャネルの Ca^{2+} 透過性亢進により神経細胞死を引き起こす直接原因になり、しかも変異 SOD1 関連家族性 ALS には生じない高い疾患特異性をもつことから孤発性 ALS の運動ニューロン死を引き起こす直接原因であると考えた。この分子変化の上流として GluA2 Q/R 部位の RNA 編集は RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA type 2 (以下 ADAR2) により特異的に触媒されるため、孤発性 ALS 運動ニューロンでは ADAR2 活性が低下しているという仮説を立てた。ADAR2 ノックアウトマウスは痙攣重積で生後 3 週間以内に死亡するため、Cre/loxP システムを利用し、ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス (ADAR2^{fllox/fllox}/VChT-Cre.Fast; AR2. 以下、AR2 マウス) を開発し、運動ニューロンにおける ADAR2 欠損が、進行性の運動機能低下をきたし、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集異常、緩徐な運動ニューロン死を引き起こすことを報告した (Hideyama T, et al J Neurosci., 2010)。とくに Ca^{2+} 透過性 AMPA を介するニューロン死が緩徐進行性であること、脳神経核のうち動眼神経核の脱落が無かったことは ALS の臨床経過に合致した重要な知見である。以上から、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集異常は孤発性 ALS 運動ニューロンに生じている特異的分子異常であり、この分子異常は ADAR2 の酵素活性低下が原因であることを示した。

2. 研究の目的

孤発性 ALS では、グルタミン酸受容体サブユニットである GluA2 の RNA 編集異常が疾患特異的に生じていることを、約 30 例の孤発性 ALS 例と疾患対照、正常対照例の剖検組織の検討から明らかにした (Hideyama T et al Neurobiol Dis., 2012)。また、この分子異常が運動ニューロン死の直接原因になることを AR2 マウスの動物実験から明らかにした (Hideyama T, et al J Neurosci., 2010)。本研究の目的は、これらの成果を発展させ、未解明である上位運動ニューロンの変性の原因を探ることである。RNA 編集異常が下位運動ニューロンである脊髄運動ニューロンのみではなく、上位運動ニューロンを含む大脳大型ニューロン (神経節細胞層: 第 V 層) の細胞死の原因となっているかどうか、上述した疾患モデルマウスを用い、免疫組織化学的に検討し、上位運動ニューロンの変性の原因、その病因的意義を明らかにすることを目的とする。そのため、AR2 マウスを用い、12 ヶ月齢 (n=5) の上位運動ニューロンを含む大脳大型ニューロン (神経節細胞層: 第 V 層) に同様の分子異常が及んでいるかどうか、野生型マウスと比較し、病理組織及び免疫組織化学的に検討した。

3. 研究の方法

AR2 マウスの脊髄運動ニューロンは 2~3 ヶ月齢から経時的に脱落し、12 ヶ月齢で約 50 % まで細胞死を来す (Hideyama T, et al J Neurosci., 2010)。その結果をふまえて大脳の運動野 primary motor cortex (M1) と secondary motor cortex (M2) における神経節細胞層 (第 V 層) について Nissl 染色で正常対照群と比較し、大型ニューロンで細胞死が生じているか検討した。AR2 マウス 12 ヶ月齢 (n=5) を灌流固定後、スクロース置換法により、10 μm の凍結切片を作製し、正常対照群 (n=5) と比較した。

また、抗 GFAP 抗体 (Abcam) にてグリオーシスの有無、抗 TDP-43 抗体 (Protein-Tech Group) にて異常が認められるようなニューロンと正常に見えるニューロン間で免疫組織化学的な差が生じるか、抗 ADAR2 抗体 (RED1; Exalpha Biologicals) を利用し、ADAR2 活性との関連に注目し

検討した。

4. 研究成果

大脳運動野 M1 と M2 における 30 μm 以上の大型ニューロンにおいて、正常対照群と比べて AR2 マウスでは有意に減少が認められた (Mann-Whitney U 検定, $p < 0.001$)。また、内包の大きさも AR2 マウスでは有意に縮小していた (Mann-Whitney U 検定, $p < 0.05$)。そして、抗 GFAP 抗体での検討では正常対照群ではほとんど認められなかった reactive astrocytes が AR2 マウスの M1, M2 のいずれの領域でも有意に増加しており (Mann-Whitney U 検定, $p < 0.01$)、神経細胞死を支持した。

さらにこの細胞死が ADAR2 活性低下により生じているのか、抗 ADAR2 抗体と抗 TDP-43 抗体による二重染色をすることで検討を加えた。その結果、正常対照群での運動野 (M1, M2) の 30 μm 以上の大型ニューロンにおいてはすべて抗 ADAR2 抗体陽性であり、TDP-43 は核内にのみ局在が得られたことに対し、AR2 マウスでは抗 ADAR2 抗体が弱陽性あるいは陰性という ADAR2 活性が低下した大型ニューロンでは TDP-43 が核内から減少あるいは消失しており細胞質に見られるといった孤発性 ALS で認められる TDP-43 病理が観察された。

以上から AR2 マウスでは大脳運動野の大型ニューロンが減少しており、下位運動ニューロンと同様の変性が生じていることが分かった。グリオシスの増加や内包の萎縮と合わせて上位運動ニューロンについても神経細胞死が生じていることを支持した。さらに ADAR2 活性が低下している大型ニューロンでは TDP-43 病理が観察された。このように変性過程で孤発性 ALS 患者と同様の TDP-43 病理を呈することから上位運動ニューロン障害の病因を考える上で重要な手がかりを有していると考えられ、時間的経過と部位特異性を合わせた検討を進めている。

これらの結果から AR2 マウスは下位運動ニューロン障害だけでなく、上位運動ニューロン障害についても孤発性 ALS 患者と同様の神経変性を呈することからモデル動物として有用であると考えられ、病因解明への糸口となること、さらに治療効果を検討する上で、より患者の臨床像を反映することが期待される。これらの解明は神経変性疾患の神経細胞死の原因究明に役立つと考えられ、治療戦略に反映させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naito Makiko, Hideyama Takuto, Teramoto Sayaka, Saito Tomoko, Kato Haruhisa, Terashi Hiroo, Kwak Shin, Aizawa Hitoshi	4. 巻 444
2. 論文標題 Pathological features of glial cells and motor neurons in the anterior horn of the spinal cord in sporadic ALS using ADAR2 conditional knockout mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 120520 ~ 120520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jns.2022.120520	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Haruhisa, Naito Makiko, Saito Tomoko, Hideyama Takuto, Terashi Hiroo, Kwak Shin, Aizawa Hitoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of Serum Perampanel Concentration on Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neurology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3988/jcn.2022.0213	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 Kato Haruhisa, Naito Makiko, Saito Tomoko, Hideyama Takuto, Suzuki Yasuhiro, Kimura Takashi, Kwak Shin, Aizawa Hitoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Prolyl Isomerase Pin1 Expression in the Spinal Motor Neurons of Patients With Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neurology	6. 最初と最後の頁 463 ~ 463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3988/jcn.2022.18.4.463	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 日出山拓人, 郭 伸	4. 巻 41巻 3号
2. 論文標題 AMPA 受容体と運動ニューロン死	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 351 ~ 356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aizawa Hitoshi, Teramoto Sayaka, Hideyama Takuto, Kato Haruhisa, Terashi Hiroo, Suzuki Yasuhiro, Kimura Takashi, Kwak Shin	4. 巻 436
2. 論文標題 Nuclear pore destruction and loss of nuclear TDP-43 in FUS mutation-related amyotrophic lateral sclerosis motor neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 120187 ~ 120187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2022.120187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 H Aizawa, T Hideyama, H Kato, H Terashi, Y Suzuki, T Kimura, S Kwak
2. 発表標題 Nuclear pore destruction in FUS mutation-related ALS motor neurons
3. 学会等名 第63回神経学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 T Hideyama, S Teramoto, M Naito, J Yamazaki, T Saito, H Kato, S Kwak, H Aizawa, H Terashi
2. 発表標題 Analysis of TDP-43 pathology for upper motor neurons in ADAR2-conditional knockout mice
3. 学会等名 第64回神経学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T Hideyama, M Naito, S Teramoto, T Saito, J Yamazaki, H Kato, S Kwak, H Aizawa
2. 発表標題 Research of pathogenesis for upper motor neuron dysfunction of ALS in conditional ADAR2 knockout mice
3. 学会等名 第63回神経学会大会
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 T Hideyama, M Naito, S Teramoto, T Saito, H Kato, S Kwak, H Aizawa
2 . 発表標題 Analysis of pathogenesis for upper motor neuron dysfunction of ALS using ADAR2 knockout mice
3 . 学会等名 第62回神経学会大会(2021年5月)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 M Naito, T Hideyama, S Teramoto, T Saito, H Kato, S Kwak, H Aizawa
2 . 発表標題 Characteristics of glial cells in the anterior horn of the spinal cord in ADAR2 knockout mice
3 . 学会等名 第62回神経学会大会(2021年5月)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 M Naito, T Hideyama, S Teramoto, T Saito, H Kato, S Kwak, H Aizawa
2 . 発表標題 Pathological findings of glial cells in the anterior horn of the spinal cord in sporadic ALS using ADAR2 knockout mice
3 . 学会等名 第62回日本神経病理学会総会学術研究会(2021年5月)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 M Naito, T Hideyama, S Teramoto, T Saito, H Kato, S Kwak, H Aizawa
2 . 発表標題 Exploration of pathogenesis for central nervous system dysfunction and changes in glial cells of sporadic ALS employing model mice
3 . 学会等名 第186回東京医科大学医学会総会(2020年11月)
4 . 発表年 2020年

1. 発表者名 Aizawa H, Yamashita T, Kato H, Kimura T, Saito T, Teramoto S, Hideyama T, Kwak S
2. 発表標題 Impaired nucleoporins in sporadic ALS motor neurons that exhibit mislocalization of TDP-43
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会(2019.5.22-25)大阪
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 相澤仁志, 山下雄也, 加藤陽久, 木村 隆, 齋藤智子, 寺本さやか, 日出山拓人, 郭 伸
2. 発表標題 Disrupted nuclear pore complex with mislocalization of TDP-43 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis motor neurons
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会学術大会 (2019.7.14-16) 名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuto Hideyama, Sayaka Teramoto, Makiko Naito, Tomoko Saito, Haruhisa Kato, Kwak Shin, Hitoshi Aizawa
2. 発表標題 Exploration of pathogenesis for upper motor neuron dysfunction of sporadic ALS employing model mice
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会(2020.5月)岡山
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1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
---------	---------