

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07996

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症の脊髄に存在するグリア炎症とガレクチン3、p22の意義と治療

研究課題名(英文) Significance of and treatment against galectin-3 and p22 accompanied with glial inflammation in ALS spinal cord

研究代表者

林 信太郎 (HAYASHI, SHINTARO)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90312876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病態と治癒させる方法は現在も不明である。TDP-43病理の発見以来、ALSの変性は運動系を超えて広範囲に及ぶ事が明らかとなった。私達は運動系以外の領域のうち脊髄前・側索から錐体路を除いた部に存在するびまん性の髄鞘淡明化と、そこに一致して出現する活性化ミクログリアに着目して研究を続けて来た。この過程でグリア性炎症関連分子であるgalectin-3とp22に着眼するに至り早期診断マーカーとしての有用性と治療効果について解析した。この結果、現時点で有意な所見を見い出せていないが、解析の際に見落としがちなALS検体特有の盲やその修正法について考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSが最初に文献に記載され1世紀以上が経過しているものの、現在も病態は不明である。早期診断マーカーがない事実は、今後何らかの治療法が世に出たとしても患者は早期に治療を受ける機会を逸する事を意味する。今回私達は新しい視点でgalectin-3とp22という活性化ミクログリア関連分子に着目しALSの早期診断マーカーとしての有用性の検証と治療方法の樹立を試みた。残念ながら現段階で有意な結果を得られていないが、ELISA法やプロテオーム解析を用いた実験を行うにあたりALS検体特有のpit fallが示唆されたのでその改善策を考察し、今後同じ目的の研究が円滑に行われるための情報の一端を提供した。

研究成果の概要(英文)：The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) still remains to be elucidated, and the absence of distinct treatment is the matter to break through in this devastating disorder. After discovery of TDP-43 pathology, it is well known that degeneration of ALS spreads beyond the motor system, and among those areas, we have focused on the diffuse myelin pallor in the anterolateral funiculi outside the corticospinal tracts and massive microglia/macrophage infiltration in the corresponding region. These findings prompted us to examine involvement of activated microglia-associated molecules, galectin-3 and p22, by ELISA and proteome analyses, and to test if these two molecules are useful as early diagnostic marker and treatment targets of ALS. Presently, no significant results have been observed; however, during this study, several pitfalls for using ALS specimens and the ways how to minimize them are indicated, which might shed light on future studies sharing similar objectives.

研究分野：神経病理

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 グリア性炎症 脊髄前・側索 髄鞘淡明化 血液脳関門 ELISA 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)は、最重症の神経難病と考えられ進行性の上位・下位運動ニューロン障害を呈する。1909年に Gordon Holmes が詳細な病理像を記載して以来 100 年以上が経過したものの現在も病態は未解明で根治療法はない。発症から確定診断まで平均13ヵ月を要する (Iwasaki et al, Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disorders 2001)問題は解決されておらず、更に診断バイオマーカーは未だに開発の糸口さへ立っていない。これは有効な治療法を開発する上で大きな妨げとなっている要因であり、克服すべき課題である。

私達は、ALS 患者変性組織で認められるグリア炎症に着目して研究を継続して来た。これまでの主要な発見は、以下の通りである。①患者脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF)中のサイトカイン/ケモカインの網羅測定 (multiplexed fluorescent immunoassay)で、CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1)は臨床的重症度 (ALSFRS-R)と有意に負相関する (Tanaka et al. J Neuropathol Exp Neurol 2007, Tateishi et al. J Neuroimmunol 2010)。②患者剖検組織を用いた病理学的検討で、70%の症例 (21/30 例)では脊髄の前索と側索 (前側索)を併せた広範な領域に一致して、顕著なミクログリア (microglia, Mi)/マクロファージ (macrophage, Mφ)の浸潤がある (図1) (Hayashi et al. J Neurol Sci 2013; Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 2018)。③Mi/Mφの形態差及び脊髄内局在差と運動ニューロンの TDP-43 病理との関連を検討し、前側索に存在する泡沫状 Iba-1 陽性 Mi/Mφ数は TDP-43 病理と有意に正相関し、同領域の非泡沫状 Iba-1 陽性 Mi/Mφ数は負の相関傾向(有意差はなし)を示した事から、運動ニューロンに対して前者は神経障害に作用する可能性がある (Hayashi et al, Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 2016)。④泡沫状 Mi/Mφのうち galectin-3 (Gal3)陽性細胞は錐体路 (corticospinal tract, CST)と錐体路を除いた前側索 (anterolateral funiculi outside the corticospinal tract, ALFoc)に選択的に浸潤するが、前角 (ventral grey matter, VGM)には出現しないユニークな分布を呈し、運動ニューロンの TDP-43 病理と有意に正相関する (Hayashi et al, Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener 2016) (図2)、⑤運動ニューロンが残存する VGM には p22 陽性 Mi/Mφ を顕著に認める (図3)が CST や ALFoc には認めない。以上から、ALS 脊髄では Gal3 陽性 Mi/Mφ は運動ニューロン変性に関与し、p22 陽性 Mi/Mφ は変性初期に関与するとの仮説を立てた。Gal3 はβガラクトシド結合タンパクファミリーの一つで Mφの活性化やアポトーシスに作用すると共に細胞膜や核などに発現し細胞外へ分泌される蛋白でもある。ALS 研究で世界的に利用される SOD1 transgenic (Tg) マウス (G93A) 脊髄では、この Gal3 の発現が亢進している事は確認されている

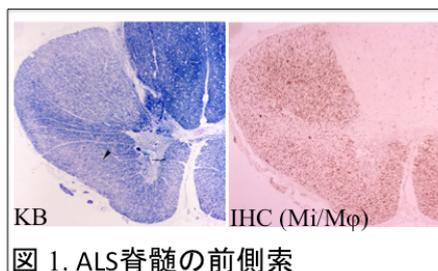


図1. ALS脊髄の前側索

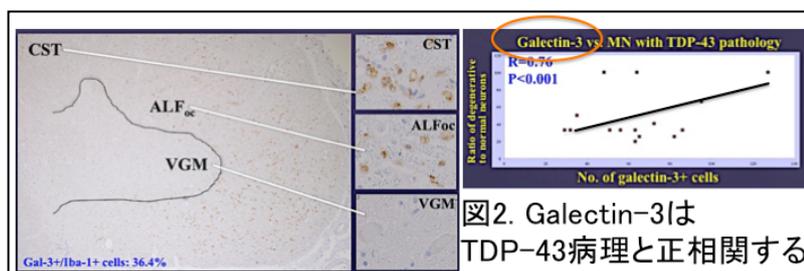


図2. Galectin-3は TDP-43病理と正相関する

(Zhou et al. J Proteome Res 2010)。P22は膜蛋白質である phagocyte NADPH oxidase の主要構成分子で、活性酸素産生に作用する。これまでに ALS 病態における p22 について、ヒト、モデ

ル動物を含めて詳細な研究報告はない。

以上の発見を元にした本研究の学術的な問いは、①Gal3 と p22 は ALS の有効な治療標的となり、②早期診断マーカーにもなるのではないか、③他のグリア炎症関連分子と運動ニューロン変性との相関や因果関係を検討する効率的な実験手法は何か、と要約できる。

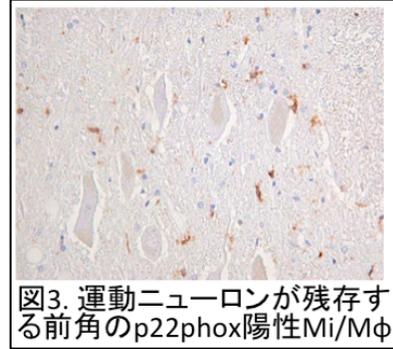


図3. 運動ニューロンが残存する前角のp22phox陽性Mi/Mφ

## 2. 研究の目的

- 1) ALS患者CSF中のGal3、p22の診断マーカーとしての有用性を明らかにする。
- 2) Gal3、p22に対するモノクローナル抗体のモデル動物に対する治療効果を検討する。
- 3) 運動ニューロン変性と相関する、その他のグリア炎症関連分子を同定する。

## 3. 研究方法

### (1) ALS 患者 CSF 中における Gal3、p22 の早期診断マーカーとしての有効性の検証

本研究における「早期」の定義は、患者が ALS 疑いで当科に紹介されてきた時期とする。その後、El Escorial 改定診断基準で definite、clinically probable、或は clinically probable laboratory supported ALS に該当した患者の、入院時に採取し 2 時間以内に凍結保存 (-80℃) した CSF (遠心分離により細胞成分を除いた検体) の Gal3、p22 濃度を ELISA 法で測定し非 ALS 例と比較する。同一患者の保存検体で入院時と診断後に採取された CSF も調べ、病気の重症度 (ALSFRS-R) や進行度との相関解析を行う。

### (2) ALS モデル動物に対する抗 Gal3 抗体、抗 p22 抗体の治療効果の検討

Gal3、p22 へのモノクローナル抗体を作成し、SOD1 Tg マウス (G93A) の髄腔内にポンプを用いて少量持続投与し、発症時期と生存期間の変化を臨床所見、病理所見と共に評価する。投与のタイミングは発症前 (8 週頃) とし、その後本モデルの発症時 (12 週)、極期 (16 週)、末期 (20 週) の各時点で運動機能評価 (Rotarod test、grip power test) や体重測定を行い (各群 n=4~6)、セボフルレンで麻酔し PBS と 4%パラフォルムアルデヒドで灌流固定、取り出した頸髄、胸髄、腰髄に HE 染色、KB 染色、免疫染色 (ABC 法、免疫蛍光染色法) をし、Mi/Mφ の浸潤量や浸潤領域、運動ニューロンの TDP-43 病理を顕微鏡 (光学、共焦点レーザー) で観察、定量評価や相関解析を行う。

### (3) 同一 ALS 患者の発症前・早期脊髄、発症後脊髄を用いたプロテオーム解析

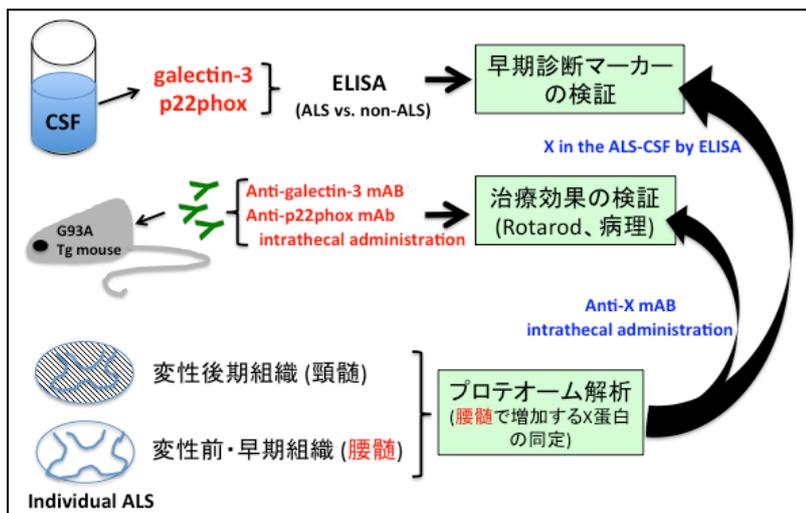
私達は、progressive bulbar palsy として発症し、上肢の運動麻痺は軽度~中等度、下肢の筋力は正常な時期に突然死 (痰の窒息と推定された) した 5 症例の ALS 剖検標本を収集した。これらの症例では、頸髄は変性後期、腰髄は変性前・早期の病理を反映すると考えられるので、変性カスケードの時期が異なる所見をヒトの剖検標本として体系的に解析できる事が考えられる。凍結脊髄組織をホモジェナイズし蛋白濃度を測定、蛋白溶解液 (~60 μg protein/sample) を作成し 9%SDS ゲルで電気泳動を行いクマシー-G250 で染色する。各レーンを切り取りトリプシン消化したペプチド試料を、nanoscale LC-MS/MS (LTQ mass spectrometer, Thermo Finnigan) で解析する (Zhou, et al. J Proteome Res 2010)。この結果得られた m/z、MS/MS スペクトルを利用しデータベース検索を行う。もし変性後期病巣と比較し変性前・早期病巣で有意に変化している蛋白分子を同定できた場合、上記 (1) と (2) の検討へ進む。更に同定蛋白への一次抗体を用いて免疫染色を施行し、顕微鏡 (光学、共焦点レーザー) で脊髄内を CST、ALFoc、VGM、後索に分けて観察して陽性細胞数や分布を同定、運動ニューロンの TDP-43 病理との相関関係を解析する。

有意な相関を認めた場合、上記の(1)と(2)の実験へ進む。

本研究方法を要約したシエーマを示す(右図)。

#### 4. 研究結果

2019年度はELISA法によりALS患者CSFにおけるGal3 (LS-F442, LSBio)、p22 (MBS7244670, CYBA)の測定を行った。まず予



備実験として非ALS(筋疾患)1例とALS症例のうち剖検組織でGal3陽性ミクログリアを多数認めた1例のCSF(150 $\mu$ l/sample)を用いた。2倍、20倍、200倍、2000倍希釈液を測定繰り返し数N=2で測定した所、全希釈液において測定感度以下の結果であった。そこで別の非ALS2例(慢性炎症性脱髄性多発根神経炎1例、多発性硬化症1例)と別のALS2例の検体を用いて同じ方法で測定したが測定感度以下であった。次にp22について非ALS例、ALS例とも上記と同じ症例検体を用いて測定したが何も測定感度以下であった。この結果の解釈として、ALSのCSFではGal3とp22は共に増加していない可能性は考慮され、また検体保存(-80 $^{\circ}$ C)期間(平均:ALS検体4.9年、非ALS検体1.6年)が不適切であった可能性も除外できていないが、過去に検討例のない実験でもあるので、この段階で実験を終了せず以下の方法を修正案として更に解析を進める事にした。①CSFを原液で測定する、②CSFを濃縮してから測定する、③組織内のGal3やp22含有量について免疫染色の結果からのみでなくwestern blottingを行いその結果を参考にタンパク量の多い症例に限ってCSF検査へ進める、④冷凍保存(-80 $^{\circ}$ C)したCSFでなく新たな症例のサンプル採取直後にELISAを行ってみる、⑤他のELISAキット、あるいは超高感度デジタルアッセイ技術であるsingle molecular assayに変更する、⑥測定対象をCSFでなく血清に変更する、である。2020年度はGal3の測定について上記修正案のうちELISAキット(Human Galectin-3 ELISA Kit; ab188394, Lot. GR3313727-1)を変更して行った。ALS10例、ALS mimics(初診時にALSが疑われたかものの精査後に他疾患の診断となった症例)5例、非ALS疾患8例、合計23例のCSFを対象とした。この結果(平均 $\pm$ 標準偏差、ng/mL)、ALS例(A群)0.607 $\pm$ 1.615、ALS mimics(M群)0.467 $\pm$ 0.356、非ALS(C群)0.591 $\pm$ 1.444であり(図4)、今回は測定値を得る事ができたものの、群間比較において何れの組み合わせでも有意差は検出されなかった。ただし本実験で得られた測定値の内訳をみると、ALS10例中8例、ALS mimics5例中1例、非ALS8例中6例が測定感度以下であり、これ

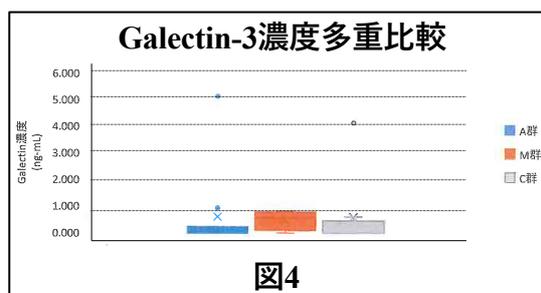
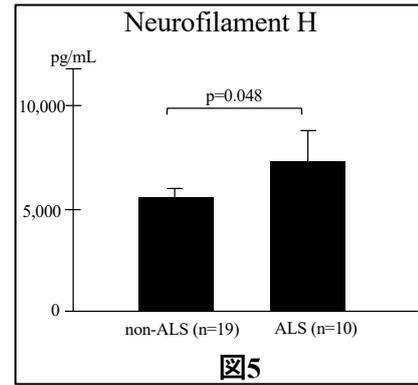


図4

らの計測値を用いて統計学的比較を行うことには問題が残り、今後さら検討症例数を増やすべき必要性が考慮された。なお今回のELISA法による検討では測定感度以下の結果が続出した理由が技術的エラーによるものではない事を確認するために、ALSのCSFで増加しているはずのneurofilament heavy chain(NfH)(Poesen K, et al. Front Neurol 2018)の測定も行った。この結果(図5)、全検体においてNfHは検出され、コントロールと比較してALS検体で有意に

増加していたことから、今回の結果について技術的エラーに由来するものではないと考える。次に Ga13 と p22 へのモノクローナル抗体を作成し、両者を別々にポンプを用いて SOD1-Tg mouse (G93A) (n=4) の髄液内に持続的注入を行った。この後、本モデルの臨床的末期に相当する 20 週まで観察を行ったが何れのモノクローナル投与においても非注入群 (n=4) と比較して rotarod test、grip power test とともに有意な変化は生じず、病理学的検討においても特記すべき差を認めなかった。以上の結果から、今回抗 Ga13 抗体、抗 p22 抗体の SOD1-Tg mouse に対する治療効果は確認できなかったが、この理由として両抗体は神経変性保護に作用しない可能性と共に、Ga13 と p22 の病理はそもそも孤発性 ALS 患者組織で認めたにもかかわらず、今回遺伝性 ALS モデル動物を検討対象として選んだ実験設定が不適切であった可能性も考慮すべきである。2021 年度は、ALS 発症早期脊髄に特異的な新規ミクログリア関連蛋白を検出するために必要な reference を決定するために、まず発症後期脊髄(n=3)を用いて MALDI-TOF MS で解析した。この結果、3 例とも m/z 615 のピーク強度が増加しており、m/z655 のピーク強度は減少していた。この状況においては一般的に、血液が混入しており目的タンパク質の検出が困難となる可能性を考慮すべきである。血液混入の原因として剖検組織作成の際に血抜きが不十分だった事も考えられるが、血液脳関門の破綻が観察されている ALS の炎症組織を用いた実験では、技術的エラーでなく病態と関連して元々末梢血が組織に存在した可能性もある。この点を区別するために、今後 m/z615 と 655 のピーク強度の変化のない組織を選定し検討する必要性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, Kira J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Axonal protein, calretinin, stimulates microglia to produce chemokines associated with clinical severity of ALS	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Exp Neuroimmunol	6. 最初と最後の頁 -
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 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 Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, Okamoto K, Kira J.	4. 巻 60
2. 論文標題 Calcium-binding proteins stimulate microglia to induce pro-inflammatory mediators relevant to ALS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rinsho Shinkeigaku	6. 最初と最後の頁 S364
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 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 Yanagihara Y, Hayashi S (2番目), Kira J, et al.	4. 巻 40
2. 論文標題 Immunotherapy-refractory vacuolar myopathy with mucin deposition in scleromyxedema: a possible role of fibroblast growth factor 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 492-495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12659.	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 Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, Kira JI, et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Microglial galectin-3 in the spinal white matter is a key molecule for motor neuron degeneration in ALS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener	6. 最初と最後の頁 74-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21678421.2019.1646546	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 Saitoh BY, Hayashi S (5番目), Kira JI, et al.	4. 巻 31
2. 論文標題 Discriminative clinical and neuroimaging features of motor-predominant hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids and primary progressive multiple sclerosis: A preliminary cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mult Scler Relat Disord	6. 最初と最後の頁 22-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.msard.2019.03.008	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9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 林信太郎、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 Axonal protein stimulates microglia to produce pro-inflammatory cytokines relevant to ALS.
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術集会（京都、WEB、ポスター）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林信太郎、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 軸索蛋白であるカルレチニンはミクログリアを刺激しALSの臨床的重症度と相関するケモカインを産生する
3. 学会等名 第33回日本神経免疫学会学術集会（佐賀、WEB、口演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashi S, Yamasaki R, Kira JI
2. 発表標題 Axonal protein, calretinin, stimulates microglia to produce chemokines associated with clinical severity of ALS
3. 学会等名 32nd International Symposium on ALS/MND (WEB, poster) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashi S, Yamasaki R, Kobayakawa Y, Kira JI
2. 発表標題 Axonal protein, calretinin, stimulates microglia to produce chemokines that are associated with clinical severity of ALS
3. 学会等名 Pan-Asian Consortium for Treatment and Research in ALS (Nagoya, WEB, poster) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hayashi S, Yamasaki R, Okamoto K, Kira J.
2. 発表標題 Calcium-binding proteins stimulate microglia to induce pro-inflammatory mediators relevant to ALS
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術集会 (岡山、誌上发表、口演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林信太郎、山崎亮、吉良潤一
2. 発表標題 カルシウム結合蛋白によるグリア炎症惹起性の検証-筋萎縮性側索硬化症患者の脳脊髄液所見との比較-
3. 学会等名 第32回日本神経免疫学会学術集会 (石川、WEB、口演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 信太郎, 山崎 亮, 岡本 幸市, 吉良 潤一
2. 発表標題 Macrophage galectin-3 in spinal white matter is a key molecule for TDP-43 pathology in ALS
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術集会 (大阪、ポスター)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 信太郎, 山崎 亮, 岡本 幸市, 吉良 潤一
2. 発表標題 ALS脊髄白質に出現するgalectin-3陽性ミクログリアはTDP-43病理と正相関する
3. 学会等名 第31回日本神経免疫学会学術集会 (千葉、口演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shintaro Hayashi, Ryo Yamasaki, Koichi Okamoto, Jun-ichi Kira
2. 発表標題 Microglial galectin-3 in the spinal white matter is a key molecule for motor neuron degeneration in ALS
3. 学会等名 30th International symposium on ALS/MND (Australia, oral presentation) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究 分担者	山崎 亮  (Yamasaki Ryo)  (10467946)	九州大学・医学研究院・准教授   (17102)	
研究 分担者	小早川 優子  (Kobayakawa Yuko)  (40733788)	九州大学・大学病院・助教   (17102)	

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
---------	---------