

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790630
 研究課題名（和文）
 筋萎縮性側索硬化症における非自律性神経細胞死の病態解明
 研究課題名（英文） Unraveling the mechanism of the non-cell autonomous neuronal cell death in amyotrophic lateral sclerosis
 研究代表者
 山下 博史 (Yamashita Hirofumi)
 独立行政法人理化学研究所・運動ニューロン変性研究チーム・研究員
 研究者番号：60402913

研究成果の概要（和文）：

DNA マイクロアレイを用いて、ALS マウスモデルの脊髄での mRNA の変動を解析した。脊髄を構成する細胞群別発現プロファイルにより、225 個の変動遺伝子のうち 159 個の遺伝子がマクログリアに多く発現していた。マクログリア特異的に発現している MMP12 が SOD1^{G85R} マウスで 22.8 倍の上昇を示したが、SOD1^{G93A} マウスと MMP12 ノックアウトマウスの交配実験では、生存日数に影響を認めなかった。また、マクログリアの遊走に関する P2X4 ノックアウトマウスとの交配実験では、雌に生存期間が延長する傾向を認めた。

研究成果の概要（英文）：

We examined the expression level of mRNA in spinal cords of ALS mouse model. Among 225 genes which were changed in expression level, we found 159 genes were expressed abundantly in microglia by cell-type specific transcriptome. Though the expression level of matrix metalloproteinase 12(MMP12) increased by 22.8 fold in SOD1^{G85R} mice, no effect on life span was found by mating experiment crossing SOD1^{G93A} mice with MMP12 KO mice. Another mating experiment crossing SOD1^{G93A} mice with P2X4(which relates to microglial migration) KO mice showed tendency to extend life span only in female though statistically nonsignificant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：筋萎縮性側索硬化症、マクログリア、マイクロアレイ、SOD1、マトリックスメタロプロテアーゼ、非自律的神経細胞死

1. 研究開始当初の背景
 ALSは成人発症の神経変性疾患であり、選択

的な運動ニューロン死を原因とした呼吸筋を含む骨格筋の進行性筋力低下・麻痺により、患者が人

工呼吸器装着を希望しない場合は2-5年で死亡する神経難病である。ALS の約 10%は遺伝性であり、その中で最も多いものは1993年に遺伝性 ALS 家系において報告されたスーパーオキシドディスムターゼ (SOD1) の変異によるもので、これまでに100以上の異なった変異が報告されており、それらのすべてが孤発性 ALS と同様の疾患の表現型を示す。ヒト変異 SOD1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは ALS の表現型を示す一方、SOD1 ノックアウトマウスは ALS の表現型を示さない。よって変異 SOD1 の病原性は、SOD1 の本来の機能である活性酸素除去能力の喪失によるものではなく、(1) 蛋白質凝集、(2) ミトコンドリア機能障害、(3) グルタミン酸興奮毒性、(4) 軸索輸送の障害、(5) 酸化ストレス、(6) 栄養因子の欠乏、(7) 炎症の誘発等、新たに毒性を獲得することにより生じていると考えられているが、その詳細なメカニズムは未解明である。

病理学的には、ALS 患者・ALS マウスモデルに共通して病変部位である脊髄の運動ニューロンの消失以外に、アストロサイトの増生・活性化マイクログリアの増加が報告されており、またマウスモデルの脊髄組織においてマイクログリアの活性化に関連して、TNF- α やインターロイキン等の各種サイトカインや蛋白質分子が増加することが報告されているが、活性化マイクログリアの増加の意義はつい最近まで不明であった。

近年、ALS のモデルマウスである変異 SOD1 過剰発現マウスのマイクログリアから変異 SOD1 を Cre/LoxP システムを用いたコンディショナルノックアウト、又は骨髄移植の手法を用いて選択的に除去することによりマウスモデルの延命効果が得られることが報告された。また、*in vitro* において変異 SOD1 を発現するアストロサイトによって変異 SOD1 を発現していない運動ニューロンが障害されることが報告されている。以上から運動ニューロン死に至る ALS の疾患の進行には、実際に細胞死を認める運動ニューロン以外のマイクログリアの直接の関与が証明され、またアストロサイトの関与も考えられることから、マイクログリアやアストロサイトが運動ニューロン死に能動的に関与するという、非自律的神経細胞死(non-cell autonomous neuronal death)のメカニズムを解明することは重要なテーマとなっている。

さらに ALS と同様の神経変性疾患である脊髄小脳失調症 7 型 (SCA7) は原因遺伝子の ataxin-7 の CAG リピートの延長により ataxin-7 分子内のポリグルタミン鎖が延長することから小脳のプルキンエ細胞死と網膜神経細胞死がもたらされる疾患であるが、マウスにおいて、病変であるプルキンエ細胞

ではなくその支持細胞と考えられているグリア細胞にのみ変異 ataxin-7 を発現させるだけで小脳のプルキンエ細胞死が生じることが報告された。このことは、非自律的神経細胞死が ALS のみならず神経変性疾患全般に起きている可能性を示唆する。

2. 研究の目的

DNA マイクロアレイを用いて ALS マウスモデル脊髄で変動している分子を、細胞特異的な mRNA 発現プロファイルを用いることにより詳細に解析し、定量的 RT-PCR による確認や組織免疫染色による検討の後、遺伝子改変マウスを用いた交配実験を経て、マイクログリアに発現する分子で ALS の治療のターゲットとなるものを同定することを目標とする。

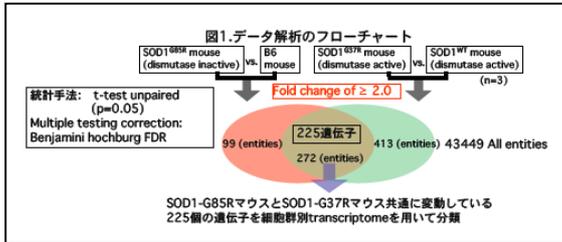
3. 研究の方法

サンプルは ALS 発症期のマウス腰部脊髄を使用し、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 18S・28S RNA バンドの確認を行った。2 μ g の全 RNA を用いて Affymetrix 社の One-cycle Target Labeling のプロトコルに沿ってビオチンラベルを行い、約 45,000 のプローブセットを持つ GeneChip(Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Arrays)への hybridization、scanning(GeneChip Scanner 3000)を経て、GeneSpring GX10 を用いてデータ解析を行った。有意に変動している遺伝子を抽出する精度を高めるため、また SOD1 活性による mRNA の発現への影響を除外する目的で、SOD1 活性が消失している G85R 変異を発現した SOD1^{G85R} マウス(発症期)と野生型マウス(age-matched)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(発症期)と SOD1^{WT} マウス(age-matched)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。細胞特異的な mRNA 発現プロファイル作成にあたり、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、マイクログリアについては、マウス新生仔からの初代培養マイクログリア(純度 99%以上)を用いて作成した。各細胞の mRNA 発現データは、MAS5 アルゴリズムにより normalize を行った。マイクロアレイによるデータから、ALS におけるマイクログリア毒性の候補遺伝子を抽出し、定量的 RT-PCR と組織免疫染色等の確認の後、変異 SOD1 発現マウスとノックアウトマウスによる交配実験を行い、治療効果を検討した。

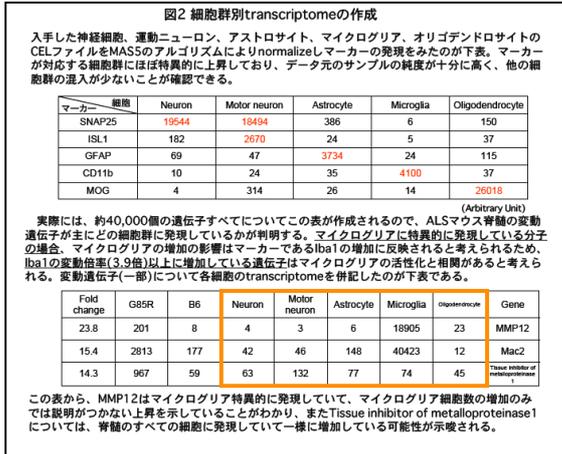
また、candidate approach から ATP 受容体である P2X4 に着目し、同様に P2X4 ノックアウトによる SOD1 マウスの治療効果について検討した。

4. 研究成果

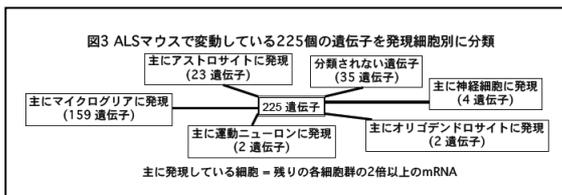
SOD1^{G85R} マウスと野生型マウスの脊髄での mRNA が 2 倍以上変動している遺伝子 (p<0.05, multiple testing corrected) が 371 個、SOD1^{G37R} マウスと SOD1^{WT} マウスの比較では 685 個の遺伝子が増加しており、双方に共通する 225 遺伝子を抽出した。(図 1)



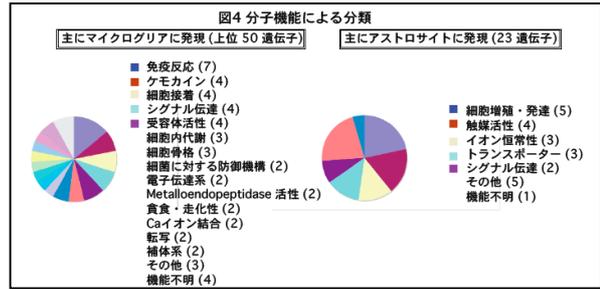
細胞特異的のマーカの変動からは SOD1^{G85R} マウスの脊髄において運動ニューロンの消失、マイクログリアの増加(Iba-1 が 3.9 倍の増加)と活性化、アストログリオシスがみられ、オリゴデンドロサイトに関しては大きな変動は認めないことが判明した。



225 遺伝子を細胞特異的 mRNA 発現プロファイル(図 2 参照)を用いて分類したところ、マイクログリアにより多く発現している遺伝子が 159 個であり最も多く、アストロサイトに多く発現している遺伝子は 23 個、神経細胞に多く発現している遺伝子が 4 個、運動ニューロン、オリゴデンドロサイトに多く発現している遺伝子は各 2 個、それ以外の遺伝子が 35 個であった(図 3)。



さらに変動遺伝子のうち、マイクログリア又はアストロサイトに多く発現しているものを分子機能で分類したものを図 4 に示す。



マイクログリアに発現が多い遺伝子のうち、マトリックスメタロプロテアーゼ 12 (MMP12) が SOD1^{G85R} マウス脊髄にて B6 マウス脊髄と比較して 22.8 倍に増加していた。MMP ファミリーを定量的 RT-PCR にて変動を検証、その中では MMP12 のみが顕著に増加することを確認した。免疫組織染色にてマウス脊髄病巣の Mac2 陽性マイクログリアの一部に MMP12 が陽性で共染色されることを確認した。MMP12 はマイクログリアの遊走に必要であり、また MMP12 による細胞外マトリックス分解産物が走化性物質として作用するとの既報告等も考慮し、SOD1^{G93A} マウスと MMP12 ノックアウトマウスの交配実験を行った。運動障害の発症時期と、生存期間について MMP12 ノックアウトの効果を検討したが、統計的に有意な変動を認めなかった。本実験から MMP12 が筋萎縮性側索硬化症において非自律的運動神経細胞死をもたらすマイクログリア毒性としては作用していないことが明らかとなった。

変異 SOD1 を発現するマイクログリアがより多くの Reactive Oxygen Species やサイトカインを産生し運動神経に対して毒性を発揮する可能性が報告されているので、脊髄病巣へのマイクログリアの遊走を抑制することにより疾患の進行を抑制できる可能性がある。マイクログリアの遊走因子の一つとして ATP が報告されており、ATP によるマイクログリアの遊走に関する受容体の一つとして P2X4 が報告されている。我々は、まず SOD1^{G93A} マウスの脊髄病巣のマイクログリアに P2X4 が発現していることを組織免疫染色にて確認した。次に SOD1^{G93A} マウスと P2X4 ノックアウトマウスの交配実験を行った。雄マウスでは、発症時期・生存期間ともに P2X4 ノックアウトの影響は認めなかった。一方、雌マウスでは生存期間が P2X4 ノックアウトにより平均生存日数が 159 日から 164 日に 5 日間の延長を示したが、統計学的有意差は検出できなかった。以上から変異 SOD1 マウスの雌においては、P2X4 活性を抑制することにより延命効果が得られる可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 1 件)
第 50 回日本神経学会総会
場所: 仙台国際センター
日時: 2009 年 5 月 20 日

山下博史, 藤森典子, 渡辺祥司, 山中宏二
「細胞特異的トランスクリプトームを用いた ALS マウス脊髄の DNA マイクロアレイによる解析」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 博史 (Yamashita Hirofumi)
独立行政法人理化学研究所・運動ニューロン
変性研究チーム・研究員
研究者番号: 60402913

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者