

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390274

研究課題名（和文） 筋萎縮性側索硬化症のグリア細胞の分子病態の解明を通じた治療法の開発

研究課題名（英文） Elucidating molecular pathology of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

山中 宏二 (YAMANAKA KOJI)

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・チームリーダー

研究者番号：80446533

研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウスのグリア病態に関連する候補遺伝子の検証を行った。ニコチン性アセチルコリン受容体( $\alpha 7$ -nAChR)の欠失により、ミクログリアの遊走能が低下し、ALSマウスの疾患進行後期を遅延することが判明した。また、*in vitro*でのグリア病態検証系としてマウス ES細胞由来運動ニューロンの分化誘導系の構築と植物由来の低分子化合物ライブラリーの整備を行った。

研究成果の概要（英文）：

In this research program, the role of the candidate genes linked to the glial pathology in amyotrophic lateral sclerosis mouse model was examined. Mice deficient of  $\alpha 7$ -nAChR gene showed slowing late disease progression in ALS mice. Moreover, ES-derived motor neuron culture and plant-derived chemical library were established as tools for investigating glial pathology *in vitro*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

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：神経変性疾患、グリア、筋萎縮性側索硬化症

## 1. 研究開始当初の背景

SOD1(Cu/Zu superoxide dismutase)変異を有する遺伝性筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者や動物モデルでは、変異蛋白はすべての細胞群に発現しているにもかかわらず、運動ニューロン特異的に変性が起こる。またALS病巣で疾患の発症、進行に伴ってアストロサ

イトの増殖やミクログリア活性化の病理像が患者、モデルマウスの両方でみられ、グリア細胞がALSの病態に関与している状況証拠が蓄積されてきている。しかし、これらの病理変化が単に神経変性に随伴した二次的な変化なのか、神経変性の過程に直接貢献する一次的な病的変化であるのかは未解明であ

った。そこで代表者らは、細胞群特異的に除去可能な変異 SOD1 (G37R 変異) を発現する新たな ALS モデルマウス *LoxSOD1<sup>G37R</sup>* を用いて、ALS の疾患進行を実行するのは運動ニューロンに起こる病的変化ではなく、グリア細胞であるミクログリアとアストロサイトに起こる病的変化であることを明らかにしてきた。このように、ALS の病態研究は、従来の神経細胞のみに着眼した研究から、グリア細胞により実行される“非細胞自律性の神経細胞死” (神経変性は神経細胞に起因する病的変化のみで自律性に起こる訳でなく非神経細胞由来の病的変化も必要である) という概念に基づいて、神経-グリア連関による神経細胞変性機構の解明へと研究の焦点の大きな転換点を迎えている。

## 2. 研究の目的

SOD1 変異を発現した ALS モデルマウスの疾患進行期の病巣における遺伝子発現の細胞群特異的な網羅的解析で見いだした遺伝子や、候補遺伝子的アプローチを通じて、神経細胞とグリア細胞の細胞間ネットワークの調節機構を破綻させる分子機構の同定を行う。また、変性病態における神経-グリアネットワーク解明のための新たな実験系として、マウス ES 細胞由来運動ニューロン培養系、植物由来化合物ライブラリーの樹立とその検証を行う。

## 3. 研究の方法

本研究課題では以下の3つの研究を行った。

(1) 疾患進行期の ALS モデルマウスのグリア細胞に異常発現する遺伝子 MMP12 (matrix metalloproteinase-12)、ミクログリア遊走に関与する遺伝子ニコチン性アセチルコリン受容体 ( $\alpha 7$ -nAChR) の ALS モデルマウス (SOD1<sup>G93A</sup> トランスジェニックマウス) の発症時期、生存期間への影響を交配実験によって検討する。

(2) マウス ES 細胞由来運動ニューロンの分化誘導系の構築。

(3) 植物由来の化合物ライブラリーの整備と化合物の変異 SOD1 タンパク質発現大腸菌におけるストレス応答への影響の検証。

## 4. 研究成果

(1) 変異 SOD1 マウスの疾患進行における2種のグリア関連遺伝子の関与の検討。

これまでの遺伝子網羅的解析で細胞外マトリックスの分解酵素である MMP-12 が、SOD1 マウスの病巣のミクログリアに高発現することを見いだしている。MMP-12 は末梢ではマクロファージから分泌され、関節炎、肺気腫など慢性炎症性疾患への関与が知られているが、中枢神経系での役割は不明である。そこで神経変性疾患における役割を検討

するために、MMP-12-KO と SOD1<sup>G93A</sup> マウスの交配実験を行い、生存期間や疾患進行への影響を検討した。MMP-12 の除去により変異 SOD1 マウスの生存期間がやや短縮する傾向がみられたが、統計学的な有意差には至らなかった。MMP-12 は神経変性疾患のミクログリアで高発現し、神経変性の病巣で分泌されていると考えられるが、その病態への影響は限定的であると考えられた。

また、第2の候補遺伝子として、ミクログリアの遊走に関与し、他の神経変性疾患の病態を修飾することが知られているニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の役割を検討した。変異 SOD1 マウスの疾患進行における  $\alpha 7$ nAChR の役割を検討するため、SOD1<sup>G93A</sup> マウスと  $\alpha 7$ nAChR KO マウスとの交配実験を行い、ALS 早期症状の期間 (病発症日～体重の10%減少日) と ALS 後期症状の期間 (体重の10%減少日～死亡日) を解析した。後期症状において、SOD1<sup>G93A</sup> /  $\alpha 7$ nAChR KO マウスは SOD1<sup>G93A</sup> マウスに比べて期間が延長する傾向が見られ (15.7 日)、この受容体が ALS の疾患進行に関与していることが示唆された。さらにそのメカニズムを解明するために、初代培養ミクログリアの遊走活性を測定したところ、ATP 誘発性の遊走はニコチンの併用により濃度依存性に抑制されることを見出した。したがって、ミクログリアにおける  $\alpha 7$ nAChR 抑制は神経保護的に働く可能性が示唆された。

(2) マウス ES 細胞由来運動ニューロンの分化誘導系、培養系の構築を行った。遺伝性 ALS モデルである SOD1<sup>G85R</sup> マウスと運動ニューロン特異的に GFP を発現する HB9-GFP マウスと交配し、その初期胚から ES 細胞を樹立した。この ES 細胞にレチノイン酸、Sonic Hedgehog (Shh) を添加する方法を用いて、運動ニューロンへの分化に必要な転写因子 HB9 の発現を指標に運動ニューロンへの分化誘導を検討した。分化誘導効率はさほど高くないものの、分化誘導が起こることを確認できた。SOD1<sup>G85R</sup> 発現運動ニューロンは、野生型 ES 細胞由来運動ニューロンよりも生存期間が短縮する傾向がみられた。

(3) 植物由来化合物ライブラリーを用いた変異 SOD1 タンパク質の異常を軽減する研究について、代表的な疾患関連 SOD1 変異体を対象に、大腸菌での異常蛋白質ストレス応答と、*in vitro* での異常化評価系の検討を行った。まず、大腸菌発現系を用いて異常タンパク質ストレス応答をモニターできる系を樹立した。この実験系を用いて、疾患変異 SOD1 の発現によって、Metal-Catalyzed Oxidation による酸化に伴うストレス応答レベルの上昇を確認した。さらに、植物由来の低分子化合物ライブラリーを用いて、そのストレス応答を促進、軽減する低分子化合物を

見いだした。

これらの研究を通じて、in vitro におけるグリア細胞病態解析ツールとしての ES 細胞由来運動ニューロン培養系と植物由来低分子化合物ライブラリーの構築を行うことができた。また、個体レベルでの ALS モデルの病態に関与する候補遺伝子の検証からは、 $\alpha 7$ nAChR 遺伝子に関しては、神経変性病態に一定の関与がみられることが判明した。

#### 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)

[雑誌論文] (計 17 件)

- ① Misawa H., 他 5 名. Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. *J. Neurosci. Res.* 90: 732-742, 2012. 査読有
- ② 山下博史, 山中宏二. ALS 病態におけるグリアの役割. *脳* 21 15: 28-33, 2012. 査読無
- ③ Lasiene J., Yamanaka K. Glial cells in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurol Res Int* 2011: 718987, 2011. 査読有
- ④ Takeuchi H., 他 14 名, Yamanaka K., Sobue G., Mizuno T, Suzumura A. Blockade of gap junction hemichannel suppresses disease progression in mouse models of amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. *PLoS ONE*, 6: 2011. 査読有
- ⑤ Okuda T., Konishi A., Misawa H., Haga T. Substrate-induced internalization of the high-affinity choline transporter. *J. Neurosci.* 31: 14989-14997, 2011. 査読有
- ⑥ 山下博史, 山中宏二. ALS-SOD1 の発症機序, *Clinical Neuroscience*, 29: 1044-1045, 2011. 査読無
- ⑦ Furukawa Y., Kaneko K., Yamanaka K., Nukina N. Mutation-dependent polymorphism of Cu, Zn-superoxide dismutase aggregates in the familial form of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* 285:22221-22231, 2010. 査読有
- ⑧ Israelson A., 他 4 名, Yamanaka K., Shoshan-Barmatz V., Cleveland D.W. Misfolded Mutant SOD1 Directly Inhibits VDAC1 Conductance in a Mouse Model of Inherited ALS. *Neuron*, 67: 575-587, 2010. 査読有
- ⑨ Narumoto O., 他 5 名, Misawa H., Yamashita N., Nagase T., Kawashima K., Yamashita N. Down-regulation of secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type pl

asminogen activator-related peptide-1 (S LURP-1), an endogenous allosteric  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor modulator, in murine and human asthmatic conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398: 713-718, 2010. 査読有

⑩ 山中宏二. 神経変性疾患における細胞死研究のパラダイムシフト, *実験医学増刊*, 28: 1188-1194, 2010. 査読無

⑪ 山中宏二, 遠藤史人. ALS の病態-非細胞自律性の神経細胞死, *医学のあゆみ*, 235: 241-245, 2010. 査読無

⑫ Lobsiger C.S., 他 4 名, Yamanaka K., Cleveland D.W., Schwann cells expressing dismutase active mutant SOD1 unexpectedly slow disease progression in ALS mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 4465-4470, 2009. 査読有

⑬ Moriawaki Y., 他 8 名, Misawa H. Primary sensory neuronal expression of SLURP-1, an endogenous nicotinic acetylcholine receptor ligand. *Neurosci. Res.* 64: 403-412, 2009. 査読有

⑭ Fujii T. Masai M., Misawa H., 他 5 名. Acetylcholine synthesis and release in NIH3T3 cells coexpressing the high-affinity choline transporter and choline acetyltransferase. *J. Neurosci. Res.* 87: 3024-3032, 2009. 査読有

⑮ Horiguchi K., 他 9 名, Misawa H., Ozaki H., Kawashima K. Expression of SLURP-1, an endogenous  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells. *J. Neurosci. Res.* 87: 2740-2747, 2009. 査読有

⑯ 山中宏二. 筋萎縮性側索硬化症とグリア細胞, *Medical Science Digest*, 35: 262-263, 2009. 査読無

⑰ 山中宏二. ALS の今後の研究方向と可能性は, *MB Medical Rehabilitation*, 113: 13-18, 2009. 査読無

[学会発表] (計 11 件)

① Yamanaka K. The active role of glial cells in familial and sporadic motor neuron disease. The 9th Biennial Conference of the Chinese Neuroscience Society, 2011 年 8 月 1 日, Zhengzhou, China

② 山中宏二. ALS におけるグリア関連病態, 第 52 回日本神経学会学術大会シンポジウム, 2011 年 5 月 20 日, 名古屋.

③ 山下博史, 他 7 名. 細胞特異的トランスクリプトームを用いた孤発性 ALS 患者脊髄の DNA マイクロアレイによる解析, 第 52 回日本神経学会学術大会, 2011 年 5 月 18 日, 名

古屋.

④ 黒川洋一. 酸化還元物質による fALS SOD1 の細胞内安定性の違い, 2010 年度日本農芸化学会大会, 2010 年 3 月 28 日, 東京.

⑤ 山下博史, 他. 変異 SOD1 発現マイクログリアにおける食食機能の評価, 第 51 回日本神経学会総会, 2010 年 5 月 22 日, 東京.

⑥ Yamanaka K. The role of glial cells in ALS. Neuro2010(第 33 回日本神経科学大会, 日本神経化学会, 合同大会) シンポジウム, 2010 年 9 月 3 日, 神戸.

⑦ 山中宏二. 神経変性疾患における非細胞自律性の神経細胞死, *BMB2010* (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会) ワークショップ, 2010 年 12 月 9 日, 神戸.

⑧ Yamanaka K. Active roles of glial cells in neurodegenerative disease. International Conference on Systems in Medicine and Biology, 2010 年 12 月 17 日, Kharagpur, India.

⑨ Yamanaka K. Glial cells as central contributors to non-cell autonomous neurodegeneration in ALS. The 3rd Korea-Japan Neuroscience Symposium, 2009 年 8 月 26 日, 釜山.

⑩ Yamanaka K. Controlling neuroinflammation through glial cells are viable target for the therapy to slow neurodegeneration in ALS. 第 32 回日本神経科学会大会 2009 年 9 月 18 日 名古屋.

⑪ 山下博史, 他 3 名. 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 DNA マイクロアレイの解析 第 50 回日本神経学会総会, 2009 年 5 月 20 日 仙台.

[その他]

ホームページ等

<http://www.brain.riken.jp/jp/faculty/details/52>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山中 宏二 (YAMANAKA KOJI)

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・チームリーダー

研究者番号: 80446533

### (2) 研究分担者

三澤 日出巳 (MISAWA HIDEMI)

慶応義塾大学・薬学部・教授

研究者番号: 80219617

黒川 洋一 (KUROKAWA YOICHI)

福井県立大学・生物資源学部・講師

研究者番号: 40326088

### (3) 連携研究者

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

渡辺 祥司 (WATANABE SHOJI)

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: 80462745