

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 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591083

研究課題名（和文） 変異 SOD1 導入グリアが引き起こす運動ニューロン傷害機序の解明

研究課題名（英文） Analysis for factors toxic to motor neurons released from astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1.

研究代表者

永井 真貴子 (NAGAI MAKIKO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：80420488

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）は運動ニューロン変性疾患で、SOD1 は家族性 ALS の原因遺伝子である。運動ニューロンと変異 SOD1 発現アストロサイトの共培養から、コントロールと比較して発現量が増加する cDNA を同定し、特に脊髄運動ニューロンにおいて発現量の多い遺伝子についてトランスジェニックマウスを作成した。脳と脊髄に導入遺伝子のタンパクの発現増加を認めたが、病理では運動神経の変性死は認められなかった。変異 SOD1 発現により発現が増加するが、運動神経変性に関与しない遺伝子である可能性が考えられた。今後その他の遺伝子群について運動ニューロン死への関与を検討する。

研究成果の概要（英文）：Mutations in superoxide dismutase-1 (SOD1) cause a form of the fatal paralytic disorder amyotrophic lateral sclerosis (ALS), presumably by a combination of cell-autonomous and non-cell-autonomous processes. In this study, we identified the cDNAs that expression increased in the primary motor neurons with astrocytes expressing mutated SOD1 (G93A) compared to control. Then, we made the transgenic mice with the one of these cDNAs which expressed most in the spinal motor neuron of G93A mice. They did not show the motor neuron death, so this cDNA we used may not cause the neuronal death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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，運動ニューロン，アストロサイト，SOD1，トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、進行性に四肢および体幹の筋萎縮・筋脱力を来とし、球麻痺・呼吸筋麻痺のため3-5年の経過で死

にいたる運動ニューロン変性疾患である。運動ニューロンの特異的な変性がなぜ起こるのか充分には明らかにされておらず、有効な治療法は未だ確立していない。一部の家族性

ALSはフリーラジカルスカベンジャーであるSOD1遺伝子の変異が原因であり、SOD1変異を導入したALSモデル動物の解析により、分子病態メカニズム解明は進展を見せている。

(2) 一方正常の運動ニューロンと変異SOD1発現アストロサイトを持つキメラマウス、マウス胎仔脊髄から初代培養した運動ニューロンと変異SOD1発現アストロサイトの共培養の研究や逆にグリア細胞を正常化したマウスの研究から運動ニューロン死にグリア細胞が関与することが示唆されてきた。

2. 研究の目的

ALSモデル動物においては、麻痺の症状を呈する前、さらに運動ニューロンの数が減少する以前から運動ニューロン周囲にグリアの増生がある。本研究では、運動ニューロンが形態学的に細胞死に至る以前にすでに生じているアストロサイトーシスが病態に与える因子を捉えることを目的とする。具体的には変異SOD1 (G93A) トランスジェニックマウスを使ってG93A発現アストロサイトが運動ニューロン死を誘導する物質、あるいは細胞死が誘導される過程で運動ニューロンが発現すること物質を同定することが目的である。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔脊髄から初代培養した運動ニューロンと変異型(G93A)あるいは野生型SOD1発現アストロサイトの共培養からmRNAを抽出し、サブトラクション法を用いて変異型SOD1で発現量が増加するcDNAのリストを作製し、BLASTで遺伝子を同定する。

(2) 続いて2.5ヶ月のG93Aマウスおよびコントロールマウス脊髄からmRNAを抽出し、(1)の候補cDNAをプローブとして、ノザンプロットティングを行い、G93Aマウスの組織においても発現量が増加しているcDNAを選択する。さらにALSマウス脊髄を用いてin situ hybridizationを行う。

(3) (2)で同定したcDNAの全長を培養細胞に導入し、変異SOD1蛋白と関係なく細胞毒性を確認し、その機序を検討する。またトランスジェニックマウスを作製し新たな運動ニューロン病のモデルを確立する。

4. 研究成果

(1) 生後1-2日のG93Aトランスジェニックマウスあるいは野生型マウスの脊髄からアストロサイトの初代培養を行った。アストロサイト単独の培養では細胞の生存率に差は認めなかった。続いてアストロサイトの初代培養上で、野生型マウス胎仔脊髄から分離し

た運動ニューロンを共培養した。運動ニューロンは単独で培養するよりも共培養を行うと軸索伸長・シナプス形成とも促進された。また長期の培養ではコントロールのアストロサイト上での生存率が高く軸索の伸長が有意に認められた。運動ニューロンとG93A発現アストロサイトの共培養から、コントロールと比較して発現量が増加するcDNAを134個同定した。BLASTを用いて検索したところミトコンドリア関連遺伝子、神経細胞の構造蛋白関連遺伝子が含まれた。

(2) G93Aマウスおよびコントロールマウス脊髄からmRNAを抽出し、(1)のcDNAをプローブとして、ノザンプロットティングを行い、組織で発現量が増加しているcDNAを4つ同定した。これらのcDNAは①G93アストロサイトとの相互作用において運動ニューロンから産生が増加したcDNA、あるいは②G93アストロサイトそのものから産生されたcDNAである可能性があると考えられたが、ALSマウス脊髄を用いてin situ hybridizationを行ったところ、発現は運動ニューロンに認められた。

(3) (2)で同定したcDNAの中から特に脊髄運動ニューロンにおいて発現量の多い遺伝子について全長をRT-PCRを用いて取り出した。タンパク発現ベクターにサブクローニングを行い、トランスジェニックマウスを作成した。マウスはC57BL/6を用い、299個のマウス受精卵に遺伝子を注入し、ファウンダーマウスは25匹産まれた。15匹が1ヶ月令まで生存したため尾からDNAを抽出しPCRで解析した結果、5匹のマウスに遺伝子の導入が確認された。新しく作製したトランスジェニックマウスの脳と脊髄を用いてウェスタンブロットティングを行ったところ、導入遺伝子のタンパクの発現増加を認めた。しかし脊髄の病理検索では運動神経の変性死は認められなかった。同定した遺伝子の中には、変異SOD1タンパク発現後に発現が増加するが、運動神経変性に関与しない遺伝子である可能性が考えられた。今後同定した他の遺伝子群について運動ニューロン死への関与の検討を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計11件)

(1) Yasuda T, Hayakawa H, Nihira T, Ren YR, Nakata Y, Nagai M, Hattori N, Miyake K, Takada M, Shimada T, Mizuno Y, Mochizuki H. Parkin-Mediated Protection of Dopaminergic Neurons in a Chronic MPTP-Minipump Mouse Model of Parkinson Disease. J Neuropathol Exp

- Neurol. 査読有 2011
Aug;70(8):686-97.
- (2) Ikeda Y, Nagai M, Kurata T, Yamashita T, Ohta Y, Nagotani S, Deguchi K, Takehisa Y, Shiro Y, Matsuura T, Abe K. Comparisons of acoustic function in SCA31 and other forms of ataxias. Neurol Res. 査読有 2011 May;33(4):427-32.
- (3) Miyazaki K, Ohta Y, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Disruption of neurovascular unit prior to motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res. 査読有 2011 May;89(5):718-28.
- (4) Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Violeta-Lukic-Panin, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. Brain Res. 査読有 2011 Jan 31;1371:161-70.
- (5) Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Ohta Y, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Matsuura T, Asanuma M, Abe K. Induction of parkinsonism-related proteins in the spinal motor neurons of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. J Neurosci Res. 査読有 2010 Jun;88(8):1804-11.
- (6) Narai H, Manabe Y, Nagai M, Nagano I, Ohta Y, Murakami T, Takehisa Y, Kamiya T, Abe K. Early detachment of neuromuscular junction proteins in ALS mice with SODG93A mutation. Neurol Int. 査読有 2009 Nov 16;1(1):e16.
- (7) Miyazaki K, Nagai M, Morimoto N, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Abe K. Spinal anterior horn has the capacity to self-regenerate in amyotrophic lateral sclerosis model mice. J Neurosci Res. 査読有 2009 Dec;87(16):3639-48.
- (8) Hoang T, Choi DK, Nagai M, Wu DC, Nagata T, Prou D, Wilson GL, Vila M, Jackson-Lewis V, Dawson VL, Dawson TM, Chesselet MF, Przedborski S. Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. Free Radic Biol Med. 査読有 2009 Oct 1;47(7):1049-56.
- (9) Sasaki S, Aoki M, Nagai M, Kobayashi M, Itoyama Y. Mitochondrial alterations in transgenic mice with an H46R mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. J Neuropathol Exp Neurol. 査読有 2009 Apr;68(4):365-73.
- (10) Miyazaki K, Nagai M, Ohta Y, Morimoto N, Kurata T, Murakami T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, Abe K. Changes of Nogo-A and receptor NgR in the lumbar spinal cord of ALS model mice. Neurol Res. 査読有 2009 Apr;31(3):316-21.
- (11) Morimoto N, Nagai M, Miyazaki K, Kurata T, Takehisa Y, Ikeda Y, Kamiya T, Okazawa H, Abe K. Progressive decrease in the level of YAPdeltaCs, prosurvival isoforms of YAP, in the spinal cord of transgenic mouse carrying a mutant SOD1 gene. J Neurosci Res. 査読有 2009 Mar;87(4):928-36.
- [学会発表] (計 4 件)
- (1) ALS 剖検脊髄の免疫染色による検討
永井真貴子, 早川英規, 荻野美恵子, 望月秀樹 第 52 回日本神経学会学術大会 2011. 5. 18
- (2) ALS 患者における黒質神経細胞脱落の検討
遠藤 基 早川英規 梁 正淵 永井真貴子 荻野美恵子 望月秀樹 第 52 回日本神経学会学術大会 2011. 5. 18
- (3) ALS 患者における栄養管理と生命予後
永井真貴子, 出口健太郎, 名古屋章子, 池田佳生, 阿部康二 第 27 回日本神経治療学会総会 2009. 6. 11
- (4) 運動ニューロンを障害する変異 SOD1 アストロサイト由来液性因子の解析
永田 哲也, Diane Re, 永井真貴子, Serge Przedborski, 阿部康二 第 50 回日本神経学会学術大会 2009. 5. 20
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.khp.kitasato-u.ac.jp/ska/shinkein/index.html>

6. 研究組織
研究代表者
永井真貴子 (NAGAI MAKIKO)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：80420488