

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591229

研究課題名(和文) グリア新生と血管新生の両者を標的としたALS脊髄再生誘導

研究課題名(英文) Gliogenesis and angiogenesis: possible regenerative targets in spinal cord of a transgenic model of ALS

研究代表者

割田 仁 (WARITA, Hitoshi)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30400245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：進行性運動神経変性を特徴とする筋萎縮性側索硬化症(ALS)における神経再生誘導療法開発のための基盤研究を行った。胎生期と異なり、成体脊髄では神経新生が生じていないが、発症後ALSモデル成体脊髄では神経前駆細胞の増殖と未成熟ニューロンの出現を認めた。中心管周囲でも有意な新生細胞増加が認められ、多くはグリア増生・グリア炎症に関与する中、未分化神経前駆細胞も増加した。血管新生調整作用をもつ因子の髄腔内持続投与で、グリア増生抑制と部分的再生現象促進が得られた。また、新たに再生反応を検出しやすいALSモデル動物の作出を行った。グリア新生および血管新生の制御が新たな治療標的となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset devastating disease characterized by degeneration of motor neurons. Although neural stem/progenitor cells reside around the central canal of adult spinal cord, neurogenesis does not occur under physiological condition. Previous reports show ed diverse results on neurogenesis in ALS model mice.

In this study, we examined a possible regenerative response in an ALS rat model. After onset of the disease, multiple immunohistochemistry with selective cell markers revealed a significant increase of neural progenitor cells around the central canal with prominent proliferation of glial cells throughout parenchyma. As compared with control, intrathecal infusion of an angiogenesis-modulating agent for 14 days significantly reduced gliogenesis, increased number of neuroblastic cells, and partial neuroprotection in the spinal cord of ALS rats.

Therefore, modulating angiogenesis or/and gliogenesis may be a novel regenerative target in ALS.

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：臨床神経分子遺伝学 神経再生 運動ニューロン 神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、系統的な運動ニューロン変性により進行性かつ全身性の骨格筋萎縮と筋力低下を生じ、平均 3~5 年で呼吸筋麻痺にいたる致死的神経変性疾患である。ALS 全体の約 90% は孤発性だが、約 10% に家族性発症を認める。家族性 ALS の約 20% を占める銅 / 亜鉛スーパーオキシド・ジスムターゼ (*SOD1*) 遺伝子を導入し全身 (ubiquitous) に過剰発現させた齧歯類の動物モデルは ALS における分子病態研究進展に大きく寄与している。しかしながら、現在もグルタミン酸による興奮性神経細胞死仮説に基づくリルゾールを除き、有効な治療法は未確立である。さらに ALS 診断マーカーが未開発な現状では早期診断が困難なため、診断確定時にはすでに多くの運動ニューロンが変性に陥っている。したがって、病因に基づく神経変性抑制のみならず、いったん失われ再生しない運動ニューロンの細胞体と神経回路を再生する「再生誘導」もまた、重要な治療法開発の柱となる。ここに ALS 病態における再生誘導療法の開発をおこなう重要な意義がある。

既存の研究報告では ALS マウスモデル脊髄における内在性再生を検索したものが数編あるが結論は一定しておらず (Chi, *et al.* Stem Cells 2006; Liu Z, *et al.* J Comp Neurol 2006; Guan YJ, *et al.* J Neurochem 2007; Chi L, *et al.* Stem Cells Dev 2007)、グリア新生の増加が共通して報告されているものの、ニューロン新生を示す十分な証左は得られていない。一方、内在する神経幹 / 前駆細胞を標的に増殖因子投与による活性化を試みた報告があるが、ニューロン新生や機能的再生は得られていない (Ohta, *et al.* J Neurosci Res 2006)。このように ALS モデル変性脊髄における内在性再生能の限界が示唆される中、その要因が微小環境 (グリア細胞、微小血管、液性因子等) と成体脊髄に内在する神経幹 / 前駆細胞そのものの特性にある可能性が想定され、その解明が期待されてきた。

## 2. 研究の目的

以上のような背景のもと本研究は、進行性の運動ニューロン変性に対して脊髄が不十分ながら発揮する再生能力 (内在性再生能) を生かし、効率的な神経再生誘導療法を開発する基盤研究を行うために計画された。具体的には、細胞外微小環境と成体脊髄に内在する神経幹 / 前駆細胞そのものの特性に取り組むため、我々の施設で開発したラットの ALS モデル (Nagai, *et al.* J Neurosci 2001) を用いて、(1) 血管新生の促進とグリア新生の抑制による再生許容環境の構築を試みること、および (2) 内在性神経幹 / 前駆細胞

を検出しやすい新しい ALS 動物モデル (ラット) を作製することの 2 点をおもな目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 血管新生促進とグリア新生抑制による再生許容環境の構築を試み：

上記ラット ALS モデル (Nagai, *et al.* ヒト変異 *SOD1* 遺伝子導入 (ALS-Tg) ラット) をヘテロ接合体として野生型 SD ラットと交配することで系統維持した。産仔はヒト *SOD1* 遺伝子特異的プライマーを用いた PCR にて確認した。

本 ALS モデル動物は約 24 週齢で発症し、約 4 週間の進行性経過を示して一側の後肢から他部位へと進展する骨格筋萎縮・筋力低下を示す。

発症前、発症早期、発症後期に病期 (各群 n=4-8) を分け、チミジンアナログを一週間全身に持続投与して新生細胞核を標識した。投与終了後、深麻酔下に 4%パラホルモアルデヒド・リン酸緩衝液にて腰髄灌流・浸漬固定後凍結切片を作製した後、各種細胞選択的マーカーとチミジンアナログに対する特異抗体を用い、多重蛍光免疫組織化学を行った。末梢組織として両後肢骨格筋 (前脛骨筋、腓腹筋) を同じく深麻酔下の摘出し、新鮮凍結切片を作成、アセトン固定後に病理組織学的解析と上記と同様の多重免疫組織化学を加えた。

共焦点顕微鏡下に関心領域のデジタル画像を取得し、専用の画像解析・定量・統計学的解析ソフトウェアを用いて、対照群 (週齢一致非遺伝子導入正常同腹仔) と比較し検討した。P<0.05 をもって有意と判定した。

その結果を経て、微小血管新生調整作用をもつ再生誘導因子を発症 7 日後の ALS-Tg ラットに 14 日間、浸透圧ポンプと細小チューブを用いて脊髄腔内へと持続投与し、上記と同様、組織学的に溶媒投与群と比較して解析した。

(2) 内在性神経幹 / 前駆細胞を検出しやすい新しい ALS 動物モデルの作製：

上記と同じ系統の ALS-Tg ラットと nestin エンハンサーおよび Hspa1b プロモーター制御下で神経幹 / 前駆細胞に蛍光蛋白 enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する (EGFP-Tg) ラット (Sawamoto, *et al.* J Neurosci 2001) とを交配し、ダブルトランスジェニック (以下 D-Tg) ラットを作成・系統維持した。得られたモデル動物を上記 (1) に記載と同様の研究手法で解析した。なお、産仔は生検尾 DNA にてヒト *SOD1* および *EGFP* 遺伝子特異的 PCR 法によって導入遺伝子を確認した。

なお、すべての遺伝子操作は東北大学 DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は東北

大学動物実験指針に従った上で動物愛護面に十分配慮し、かつ利用動物数を極力減らすように努めた。

#### 4. 研究成果

(1) 血管新生促進とグリア新生抑制による再生許容環境の構築を試み：

変異 *SOD1* 遺伝子を全身に過剰発現する ALS-Tg ラット腰髄では、発症前から病変部位の脊髄前角において新生細胞数の有意かつ進行性の増加が認められた。また発症後、運動ニューロン変性が進行する中でグリア系前駆細胞の増殖が顕著に認められた。さらに生理的条件下には検出されない表現形質をもつグリア系細胞（アストロサイト、ミクログリア）が病変の主座（脊髄前角）を中心に有意に新生・増殖していることが明らかとなった。それらの異常表現形質をもつグリア系細胞が増殖することにより、いわゆる神経炎症・グリア炎症を増悪している可能性が明らかとなった。

また、潜在的な神経新生環境と考えられている脊髄中心管周囲においては、病変の主座から離れているにもかかわらず有意かつ活発な新生細胞増加がみられ、内在性未分化神経前駆細胞の有意な増殖も認められた。生理的条件下での既報とは異なり、中心管の背側ではなく腹側優位に上記増殖が検出された。この部位においても新生細胞の多くはグリア系細胞であった。

この中心管周囲においては微小血管新生の促進と、灰白質における神経可塑性マーカー・ポリシアル酸-神経細胞接着分子の発現亢進が認められた。

上述の結果をふまえ、発症後7日という早期より、微小血管新生調整作用をもつ再生誘導因子の髄腔内持続投与を行った。発症後7日では両後肢に本 ALS-Tg ラットは筋力低下を示していた。14日間の上記持続投与を行うと、過度のグリア新生の抑制とともに、内在性再生機転の部分的促進と神経変性の部分的抑制が認められた。

以上の結果から、将来的な ALS 再生誘導療法開発をねらう場合、単なる運動ニューロン補充や神経幹/前駆細胞の増殖活性化のみならず、微小環境を再生の場（再生しやすい環境）へと形成する細胞因子としてグリア細胞新生、微小血管新生のコントロール（制御）もまた重要と考えられた。そのためには、生体内で神経系前駆細胞の増殖・分化を制御するメカニズムの分子レベルでの解明が必須と考えられる。

一方、末梢骨格筋における新生細胞解析も行った。ALS-Tg ラット骨格筋では運動ニューロン軸索変性、運動ニューロン細胞体の変性脱落に伴って慢性神経原性筋萎縮が進行することが既に知られている。この中で、生理的条件下で検出されるレベルを有意に超え

る内在性の骨格筋再生機転が存在していることが明らかとなった。

このことから、運動ニューロンの細胞外微小環境として中枢神経系の細胞体周囲のみならず、運動ニューロン末梢の支配骨格筋における軸索終末周囲もまた治療標的となる可能性が示された。以上から、運動ニューロン再生のみならず、加えて骨格筋再生促進と筋萎縮抑止による末梢からのアプローチもまた重要と考えられた。

(2) 内在性神経幹/前駆細胞を検出しやすい新しい ALS 動物モデルの作製：

ALS-Tg ラットと EGFP-Tg ラット交配による D-Tg ラットの作出を試み、F1 世代を得た。対照動物（非 Tg 野生型同腹仔、EGFP-Tg 動物）とともに、定期的な体重、運動能、筋萎縮・筋力低下の有無といった表現形質の評価を行い、また胎生期から生後、ALS 様症状の発症期（推定 24 週齢）に至るまで、神経変性の縦断的な組織学的解析も開始している。さらに現在、組織に内在する神経幹/前駆細胞と新生細胞群の組織学的解析を(1)と同様な研究手法によって実施中である。ALS モデル動物としての妥当性、および内在する神経幹/前駆細胞検出における D-Tg ラットの ALS-Tg ラットに対する優位性が確立できれば、本研究成果は再生誘導療法開発に大きく貢献するものと予想され、期待される。

#### 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4件)

Tanaka H, Shimazawa M, Takata M, Kaneko H, Tsuruma K, Ikeda T, Warita H, Aoki M, Yamada M, Takahashi H, Hozumi I, Minatsu H, Inuzuka T, Hara H, ITIH4 and Gpx3 are potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 査読有、260(7)、2013年、1782-1797

割田 仁、神経変性と機能保持・回復の神経科学的基盤、神経治療学、査読無、30(6)、2013年、718-721

Sanagi T, Nakamura Y, Suzuki E, Uchino S, Aoki M, Warita H, Itoyama Y, Kohsaka S, Ohsawa K、Involvement of activated microglia in increased vulnerability of motoneurons after facial nerve avulsion in presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis model rats. *Glia*, 査読有、60(5)、2012年、782-793

割田 仁、青木正志、ALS に対する再生医療の開発、脳 21、査読無、15(1)、2012年、57-61

〔学会発表〕(計9件)

割田 仁、水野秀紀、加藤昌昭、鈴木直輝、

青木正志、変異 SOD1 による神経変性モデル脊髄における微小血管壁細胞、第 36 回日本神経科学大会、2013 年 6 月 20-23 日、京都

割田 仁、水野秀紀、加藤昌昭、鈴木直輝、青木正志、筋萎縮性側索硬化症モデルラット微小血管の壁細胞を標的とした運動ニューロン保護、第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日、東京

加藤昌昭、割田 仁、井泉瑠美子、島倉奈緒子、安藤里紗、鈴木直輝、青木正志、東北大学における家族性 ALS 遺伝子検査の検討、第 54 回日本神経学会学術大会、2013 年 5 月 29 日-6 月 1 日、東京

割田 仁、水野秀紀、加藤昌昭、鈴木直輝、青木正志、運動ニューロン疾患モデル脊髄における増殖性グリア細胞の形質変化、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 18-21 日、名古屋

Warita H, Mizuno H, Suzuki N, Itoyama Y, Aoki M, Phenotypically transformed glial cells accumulate in adult spinal cords of transgenic rats with motor neuron degeneration、10th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research、2012 年 6 月 13-16 日、横浜

割田 仁、アカデミア発の創薬：ALS に対する HGF、第 53 回日本神経学会学術大会（招待講演）2012 年 5 月 22-25 日、東京

割田 仁、加藤昌昭、鈴木直輝、水野秀紀、青木正志、筋萎縮性側索硬化症モデルラット新生グリア細胞が形成する脊髄微小環境、第 53 回日本神経学会学術大会、2012 年 5 月 22-25 日、東京

Warita H, Mizuno H, Suzuki N, Itoyama Y, Aoki M, Adult skeletal myogenesis in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis、9th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research、2011 年 6 月 15-18 日、トロント、カナダ

割田 仁、水野秀紀、鈴木直輝、糸山泰人、青木正志、筋萎縮性側索硬化症モデルラットにおける骨格筋再生、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 18-20 日、名古屋

〔図書〕(計 1 件)

割田 仁、青木正志（総編集 辻 省次、専門編集 西澤正豊）中山書店、アクチュアル脳・神経疾患の臨床 小脳と運動失調小脳はなにをしているのか「皮質性小脳萎縮症」、2013 年、166-171 ページ

〔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.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

## 6. 研究組織

研究代表者

割田 仁 (WARITA, HITOSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30400245