

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591259

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の細胞群別の分子病態の網羅的解明

研究課題名(英文) Microarray analysis in spinal cords of sporadic ALS patients with cell-type specific transcriptome

研究代表者

山下 博史 (Yamashita, Hirofumi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60402913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロアレイを用いてALS患者の脊髄で変動している173個の遺伝子を抽出した。脊髄を構成する細胞種の相対的mRNA発現レベルがわかるトランスクリプトームの作成により、脊髄のmRNAの変動が、主にどの細胞種の関与によるものかを推定することが可能となった。ALS患者で変動している173遺伝子のうち約半数はミクログリア又はアストロサイトにより豊富に発現する遺伝子であった。それらの多くは、ALSモデルマウスでも変動していた。さらに免疫染色にて遺伝子の変動を確認した。  
本研究により多様な細胞集団である脊髄全体を用いたマイクロアレイデータから、構成細胞種を考慮したより詳細で有用な解析方法を提示した。

研究成果の概要(英文)： We employed unbiased screening to identify significantly misregulated 173 genes in sporadic ALS spinal cords with microarray. Similar experiments have been done before, therefore we went further by newly focusing on the cell-types that express misregulated genes. With cell-type specific transcriptome, we could analyze the microarray data from spinal cord samples composed of heterogenous cell-types in full detail. Nearly half of the misregulated genes in ALS spinal cords were expressed abundantly in microglia or astrocytes. Many of those genes were also changed in ALS mouse models. We confirmed that the prediction for the cell type abundantly expressing the genes were correct by the immunohistochemistry for CLEC7A, GPR65, NOX2, CHI3L1, Oncostatin M receptor, CEBPD, and calponin 3 with ALS mouse spinal cords.

We could present the useful methods for analyzing microarray data derived from spinal cord samples composed of heterogenous cell-types.

研究分野：臨床神経学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 マイクロアレイ アストロサイト ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(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。

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・活性化ミ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ミクログリアの活性化に関連して、TNF- $\alpha$ 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、活性化ミ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過剰発現マウスのミ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ミクログリアとアストロサイトの直接の関与が証明され、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。

実際にALSモデルマウスにおいて、ミクログリアの炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ や、その産生に関与するcaspase-1やミクログリアの活性酸素源であるNADPH oxidaseをノックアウトすることによりモデルマウスの延命効果を得られることは、ALSにおいて運動ニューロン以外の細胞を治療の標的とする戦略の妥当性を示している。

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、マウスモデルにおいて、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限定して変異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共通の機序である可能性を示唆する。

そこでDNAマイクロアレイを用いて筋萎縮性側索硬化症患者脊髄における網羅的なmRNA発現解析を行い、特にミクログリアとアストロサイトに発現が多い変動分子を中心に病態との関連や治療の標的になる分子

を同定することを目標とする。

### 2. 研究の目的

孤発性ALS患者脊髄をサンプルとして用いたDNAマイクロアレイを用いた研究はこれまでも報告があるが、変動遺伝子の発現細胞に着目して解析したものはない。脊髄は、運動ニューロン、運動ニューロン以外のニューロン、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト等のheterogenousな細胞集団で構成されているため、DNAマイクロアレイの結果、ある遺伝子が発動している場合に、それが運動ニューロンで発動しているのか、もしくはアストロサイトやミクログリアで発動しているのかで変動遺伝子の持つ意味合いが異なる。それは運動ニューロンで発動していれば、自律的神経細胞死との関与が示唆されるのに対し、アストロサイトやミクログリアで発動している場合は、非自律的神経細胞死への関与が示唆されるからである。そこで、脊髄を構成する細胞群特異的トランスクリプトームを利用することにより、孤発性ALSでの変動遺伝子を主に発現する細胞種別に分類し、組織免疫染色で確認することにより、ミクログリアやアストロサイトにおいて運動ニューロン死に影響を与える可能性のある分子を網羅的に解析する。

### 3. 研究の方法

孤発性ALS患者脊髄とコントロール脊髄からmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ(Affymetrix社Human Genome U133 Plus\_2.0 Array)を用いてALS患者で変動している遺伝子を抽出した。変動遺伝子の抽出に当たっては、バックグラウンドシグナルに近い低発現遺伝子を除去して1.8倍以上の変動示す遺伝子を抽出した後、数万個という膨大なプローブ数を有するマイクロアレイ特有の多重検定による偽陽性を回避するために、Benjamini & Hochberg法(BH法)によるFalse Discovery Rateの調整をした後に、t検定により有意に変動している遺伝子を抽出した。この段階では変動遺伝子が脊髄を構成する細胞種(主なものとして神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)のうち、どの細胞種によく発現しているmRNAの変動がどの細胞種の関与によるかは明らかではない。

そこで、同じ哺乳類であるマウスの各相同遺伝子の細胞種ごとの相対的発現レベルがわかるトランスクリプトームを一部データベースを利用して作成した。解析に用いるAgilent社のGeneSpring\_GXによりマウスとヒト間での相同遺伝子の変換が可能である。そのトランスクリプトームを用いることにより、ALS患者脊髄のmRNAの変動が、主にどの細胞種の関与によるものかを推定することが可能となった。

ALS 患者脊髄で変動している遺伝子の中から、ALS 病態との関連で機能的に興味深く、かつミクログリア又はアストロサイトで発現の多いものにつき、ALS モデルマウス脊髄の免疫染色にて発現変化の確認を行った。

#### 4. 研究成果

孤発性 ALS 患者脊髄(n=4)とコントロール脊髄(n=5)から mRNA を抽出し、マイクロアレイを用いて ALS 患者で変動している 173 個の遺伝子を同定した。この段階では変動遺伝子が脊髄を構成する細胞種(主に、神経細胞、アストロサイト、ミクログリア、オリゴデンドロサイト)のうち、mRNA の変動がどの細胞種の関与によるかは不明である。マウスの全遺伝子の細胞種ごとの相対的発現レベルがわかるトランスクリプトームを一部データベースを利用して作成して GeneSpring\_GX (Agilent 社)によりマウスとヒト間での相同遺伝子の交換することにより、ALS 患者脊髄の mRNA の変動が、主にどの細胞種の関与によるものかを推定することが可能となった。

その結果、孤発性 ALS 脊髄で変動している 173 遺伝子のうち約半数はミクログリア又はアストロサイトのグリア系細胞により豊富に発現する遺伝子であることが判明した。それらの遺伝子の多くは、ALS モデルマウスである変異 SOD1 マウスでも変動していた。

ALS 患者脊髄で変動している遺伝子でミクログリアに発現が多いものから、ALS 病態との関連で機能的に興味深い CLEC7A、GPR65、NOX2 について、ALS モデルマウス脊髄の免疫染色により、主に発現している細胞種がミクログリアであることと発現の増加をタンパク質レベルでも確認した。また、ALS 患者脊髄で変動している遺伝子でアストロサイトに発現が多いものからは、CHI3L1、OSMR、CEBPD、CNN3 について同様に免疫染色により、主に発現している細胞種がアストロサイトであることと発現の増加を確認した。

本研究により、heterogenous な細胞集団である脊髄全体を用いたマイクロアレイデータから、構成細胞種を考慮した、より詳細で有用な解析方法を提示した。

#### 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 2 件)

Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R.

Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant.

Acta Neuropathol Commun. 2014 Dec 10;2(1):172.

査読有り

DOI: 10.1186/s40478-014-0172-0

Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R.

Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway.

J Neurochem. 2013 Sep;126(6):699-704.

査読有り

DOI: 10.1111/jnc.12326

[学会発表] (計 2 件)

Hirofumi Yamashita、Noriko Fujimori、Hidefumi Ito、Yohei Iguchi、Naoki Atsuta、Fumiaki Tanaka、Gen Sobue、Ryosuke Takahashi、Koji Yamanaka

標題: Microarray analysis in spinal cords of sporadic ALS patients with cell-type

細胞群別にすべての遺伝子の mRNA 発現値を取得

細胞群	神経細胞	アストロサイト	ミクログリア	オリゴデンドロサイト
分離方法 (マウス日齢)	FACS(P7)	FACS(P17)	Primary culture(P1)	Immuno-panning (anti-MOG, P16)
RNA抽出				
Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array				
Intensity data files(CEL files)	神経細胞のトランスクリプトーム	アストロサイトのトランスクリプトーム	ミクログリアのトランスクリプトーム	オリゴデンドロサイトのトランスクリプトーム

CEL files は public database より入手可能(Cahoy et al. J Neurosci. 2008)。ミクログリアのトランスクリプトームのみサンプル調製し取得した。

マウス (P1-17) 細胞群別相対的トランスクリプトーム

	神経細胞	アストロサイト	ミクログリア	オリゴデンドロサイト
SNAP25	19554	386	6	150
GFAP	69	3734	24	115
CD11b	10	35	4100	37
MOG	4	26	14	26018
:	:	:	:	:
:	:	:	:	:
すべての遺伝子	X	Y	Z	W

数値は相対的 mRNA 発現量

各細胞種のマーカーがその細胞のみに特異的に高値であることを確認した。すべての遺伝子につき各細胞間の相対的 mRNA 発現値を取得した。

specific transcriptome

学会名: Nucleic Acid Summit

発表年月日: 2014年6月19日

場所: San Diego (USA)

Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, Takahashi R.

標題: Optineurin suppression causes

neuronal cell death via NF- $\kappa$ B pathway

学会名: 14th Asian & Oceanian Congress of Neurology

発表年月日: 2014年3月2日-5日

場所: Macau (China)

[図書] (計3件)

遺伝子改変による ALS モデルマウス  
医学のあゆみ(医歯薬出版)

vol.252 No.4 p309-11 (2015)

山下博史、漆谷真

脊髄の運動ニューロンと ALS

分子脳科学 2 章(化学同人) 2015年4月

山下博史、漆谷真、高橋良輔

ALS など運動ニューロン病

脳神経科学イラストレイテッド第3版

(羊土社) 2013年3月 p300-311

山下博史、高橋良輔

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下博史 (Yamashita Hirofumi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号: 60402913

### (2) 連携研究者

山中宏二 (Yamanaka Koji)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号: 80446533