

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461317

研究課題名(和文) カルレチニンと単球走化性蛋白質1を標的とした筋萎縮性側索硬化症の新規治療法の創出

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for amyotrophic lateral sclerosis targeting calretinin and monocyte chemoattractant protein-1

研究代表者

林 信太郎 (HAYASHI, SHINTARO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：90312876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の脊髄前側索に浸潤する著明なミクログリア/マクロファージ(Mi/M)と、カルレチニン(CR、カルシウム結合蛋白)あるいはCCL2(単球走化性蛋白質1)との関係について神経病理学的検討を行った。泡沫状の形態を有するMi/MのみがTDP-43病理と相関することを明らかにし、患者脳脊髄液中で増加しているCCL2はアストロサイト由来である可能性を形態学的に示した。正常ヒト脊髄のCR陽性軸索とALS患者脊髄前側索のMi/Mの分布は酷似するが、ALS動物モデルへの抗CR抗体投与、正常ラットへのCRペプチド投与実験では、共にCRの病原性を確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：We examined relationships between massive microglia/macrophage (Mi/M) infiltrations in the anterolateral funiculus of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) spinal cord and TDP-43 pathology, calretinin (CR, calcium-binding protein), and CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1). The results showed that among the Mi/M with various morphologies, the numbers of Mi/M with foamy appearance had a positive correlation with amount of motor neurons with TDP-43 pathology in ALS patients. It was also revealed morphologically that CCL2, elevated in the patient's cerebrospinal fluid, might be derived from the astrocytes. Although, distributions of Mi/M in ALS spinal cord are similar to those of CR-immunoreactive axons in normal human spinal cord, administration of anti-CR antibodies to ALS mouse model (G93A) or CR peptide to normal rat indicated no pathogenicity of CR.

研究分野：神経免疫疾患 神経変性疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 カルレチニン 単球走化性蛋白質1 ミクログリア マクロファージ TDP-43
脊髄前側索 カルシウム結合蛋白

1. 研究開始当初の背景

我々は、ALS 患者脳脊髄液中のケモカイン・サイトカインを網羅的に解析した結果、CCL2 (単球走化性蛋白質-1)や CCL4 などグリア性炎症マーカーが増加しており、CCL2 は臨床的重症度 (ALSFRS-R)と関連することをこれまでに明らかにした(Tanaka et al. J Neuropathol Exp Neurol 2007、Tateishi et al. J Neuroimmunol 2010)。しかし現在もなお、グリア性炎症を惹起する因子は不明であり、脊髄のどの領域で生じているのか、その神経病理学的・形態学的知見は十分でない。そこで孤発性 ALS 患者剖検脊髄標本を用いて、Mi/M に対する一次抗体 (CD11c 染色、Iba-1 染色)により免疫組織化学的に検討した。この結果 70%の症例で脊髄前・側索 (ALF)という限定的な領域に、活性化状態を示す円形の Mi/M が広範囲に浸潤しているが、後索には認められないことを明らかにした (Hayashi et al. J Neurol Sci 2001)。一方で、脊髄前角では静止状態を示すとされる杆状の Mi/M が主体であった。以上の所見からヒト正常脊髄 ALF に限定的かつ広範囲に発現される蛋白があれば、グリア性炎症との関連を解析する手がかりになると考えた。この発想に基づき、正常なヒト脊髄を検討した結果、カルシウム結合蛋白 (calcium-binding protein; CaBP)の一つであるカルレチニン (CR)が脊髄 ALF の軸索に発現しているが、後索には認められないことを見出した (Hayashi, et al. J Neurol Sci, 2013)。つまり ALS 脊髄でみられる Mi/M の浸潤領域と、正常ヒト脊髄の CR の分布は酷似している。以上の知見から「ALS 脊髄では CR がグリア性炎症を惹起する」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では CR が ALS におけるグリア性炎症を惹起し、運動ニューロンに TDP-43 pathology を形成する可能性を考えこれを検証し、治療法

の開発を目指す。

3. 研究の方法

a. 免疫組織化学的検討

1) 対象と方法:孤発性 ALS 患者 7 例、非 ALS 患者 (疾患コントロール)5 例の脊髄剖検標本 (ホルマリン/PFA 固定、パラフィンブロック、水平断、5 μ m 厚前後)を用いて hematoxylin-eosin 染色、Klüver・Barrera 染色、免疫染色 (ABC 法、免疫蛍光染色法)を行い、免疫細胞群の浸潤量を評価した。TDP-43 病理とグリア性炎症との関連を調べるために、錐体路 (CST)、CST を除く前・側索 (ALFoc)、灰白質前角 (AH)における免疫陽性細胞数、CST と ALFoc の軸索数、TDP-43 病理を示す運動ニューロン数を定量した。Mi の形態は、foamy と non-foamy (rod, round, elongated を含める)に分類した。

b. 患者脳脊髄液や培養グリア細胞を用いた生化学的検討

1) 脳脊髄液 (CSF)中の CR 濃度を測定した実験報告は過去にないが、Raiko らが悪性中皮腫患者の血清・血漿中の CR を sandwich ELISA 法により測定する方法を報告しているので (BMC cancer, 2010)、この方法を参考とした。CSF 中のサイトカイン・ケモカイン測定については本施設で蛍光ビーズサスペンションアレイシステム multiplexed fluorescent bead-based immunoassay による測定結果を論文に多数報告している (Ishizu et al. Brain 2005、Tanaka et al. Neurology 2008、Tateishi et al. J Neuroimmunol 2010)ので、これを用いて評価した。

2) 培養ミクログリアに CR peptide を添加して incubation した後の培地上清中の炎症性サイトカインやケモカインの濃度変化を、蛍光ビーズサスペンションアレイシステムで継続的に測定・評価を行った。

c. 正常ラットと ALS 動物モデル (G93A Tg

マウスを用いた検討

1) この実験のためにマウスよりも脊髄や前角細胞が大きく評価に有用なラットを用いた。CR peptide をラットの髄腔内に投与し、その後のラットの臨床表現系の変化を評価した。次に凍結切片を作成し、ラット脊髄の運動ニューロンの脱落、グリア性炎症の有無、TDP-43 病理について検討した。

2) 抗 CR モノクローナル抗体を作成し、G93A Tg マウスに発症前または発症後から髄腔内にポンプで少量持続投与した。これにより臨床表現系の変化や延命効果があるかを検討した。次に凍結切片を作製し、非投与マウスと比べて運動ニューロンの脱落、グリア性炎症が軽減しているかどうか、また TDP-43 病理が減少しているかを検討した。

4. 研究成果

(1) ALS 剖検例全例で、髄鞘染色で ALF 全域にびまん性の淡明化を認めた。CST と ALFoc における浸潤細胞の特徴を検討した結果、症例内、症例間ともに程度に差があるものの、次の 3 パターンに分類出来た。

ALFoc より CST で増加：CCR2 (CCL2 レセプター) (5 例)、CD45R0 (T 細胞) (5 例)、CD68 (マクロファージ) (5 例)、ALFoc と CST で同程度：CCR2 (2 例)、CD11c (樹状細胞) (4 例)、CD45R0 (2 例)、CD68 (2 例)、Iba-1 (ミクログリア) (7 例)、CST より ALFoc で増加：CD11c (4 例)。CCL2 陽性顆粒は ALS 全例の ALF に加えて、程度は軽いが後索においても認められ、形態学的にアストロサイトに発現していた。CD20 (B 細胞)、ケモカインレセプターとそのリガンドである CX3CR1、CX3CL1 では有意な所見はなく、ALS の脊髄後索やコントロールでは全マーカーについて陰性結果であった。統計解析の結果、T 細胞のみ CST で有意な増加を認めたが、その他については ALFoc と CST 間で差がなく、ALS 脊髄白質変性は錐体路のみに限局せ

ず、同程度に ALFoc にも存在することが明らかとなった (Figure 1)。

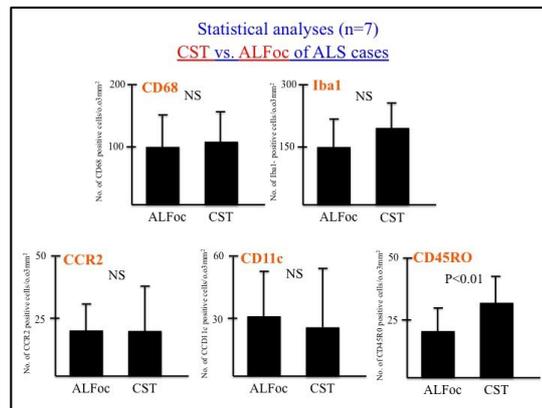


Figure 1 : ALS 脊髄の錐体路 (CST) と CST を除く前索 (ALFoc) に浸潤する免疫細胞群量の比較

以上の結果を要約すると、1) ALS の脊髄白質に出現する Mi/M は、主に末梢血単球由来であり CST のみに限局しない、2) CST と ALFoc では浸潤 Mi/M の表面マーカーと、T 細胞浸潤の程度に差があり、CST では T 細胞や末梢血由来 M が、ALFoc では樹状細胞の浸潤が強い。3) CCL2 は、CCR2 陽性骨髄系樹状細胞、単球、活性化 T 細胞の走化性因子であるため (Henkel JS et al. 2004)、ALS 脊髄白質の細胞浸潤は CCL2 発現に由来することが示唆された。

(2) 活性化ミクログリア (Mi)/マクロファージ (M) と TDP-43 病理との関係を相関解析した結果 (Figure 2, 3)、ALFoc に含まれる foamy な Iba-1 陽性細胞数のみ有意に正相関した ($r=0.673$, $p=0.0060$)。この細胞群の大半は iNOS 陽性で GDNF も一部陽性であった。また ALFoc の non-foamy な Iba-1 陽性細胞数と TDP-43 病理の間には負の相関傾向があった ($r=-0.506$, $p=0.054$)。Mi の形態差と白質軸索数に相関はなく、AH の Mi は常に non-foamy でありコントロールと比較して明らかに肥大化し、増量していた。また CST と ALFoc における Iba-1 陽性細胞、CD68 陽性細胞の形態は一致し、foamy であった (Figure 4)。

以上の観察は ALS の治療戦略における標的が ALFoc に集簇する foamy かつ iNOS 陽性の Mi である可能性を示唆する。形態差の意義として foamy は貪食、non-foamy は synaptic stripping を反映していると考えた。

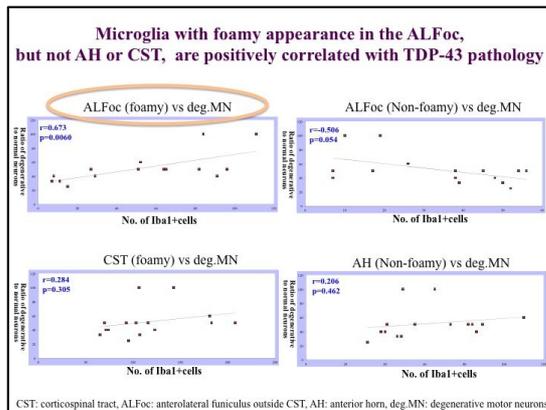


Figure 2 : ALS 脊髄の ALFoc に浸潤する泡沫状マイクログリアが TDP-43 病理と相関する

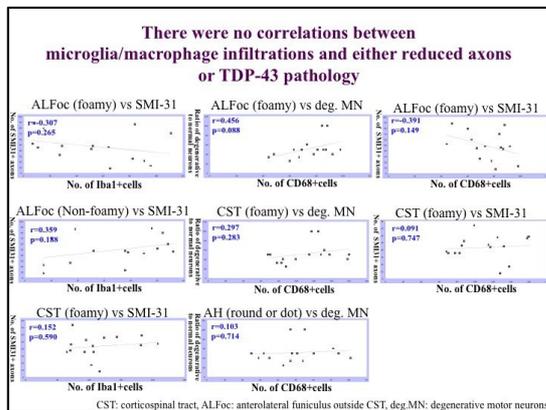


Figure 3 : ALS 患者脊髄の Mi/M 浸潤量は軸索数減少量とは相関しない。また非泡沫状 Mi/M 浸潤量は TDP-43 病理と相関しない

(3) ALS 42 症例 (M: F=20:22) の CSF 中グリア性炎症マーカーを含む炎症性サイトカン/ケモカイン濃度 (蛍光ビーズサスペンションアレイシステム) とカルレチニン (CR) 濃度 (ELISA 法) との相関について検討した。この結果、サイトカイン濃度 (pg/ml) は、CCL2 が 264.94-288.57 (平均 276.76)、CCL4 が 11.85-13.80 (平均 12.82)、IL-1 が 0.86-1.05 (平均 0.96)、TNF- が 76.58-83.12 (平均 79.85) の間に分布した。一方、CR 濃度については今回の検体で

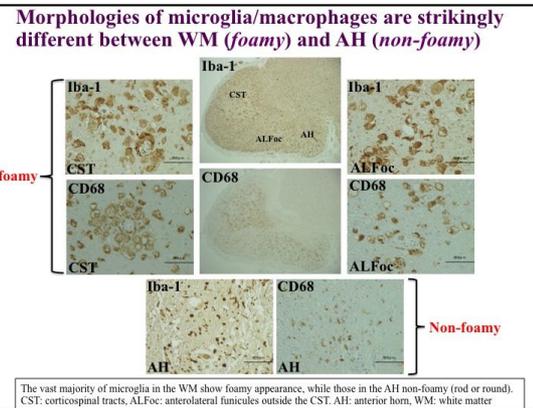


Figure 4 : ALS 患者脊髄の灰白質と白質に浸潤する Mi/M の形態は著しく異なる

測定感度以下であった。

(4) CR peptide のラット髄腔内投与 (120-150 日目まで観察) と、遺伝子改変 (Tg) マウス (G93A) の髄腔内へ抗 CR モノクローナル抗体投与 (20-24 週まで臨床表現系を観察) を行い、体重減少、rotarod、footslips で評価した。この結果、無処置群と比較して共に有意な臨床的变化は生じず、Tg マウス脊髄における TDP-43 病理、グリア系細胞浸潤、運動ニューロン数にも有意な差を認めなかった。

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 13 件)

- 1) Hayashi S, Okamoto K, et al. Loss of calretinin- and parvalbumin-immunoreactive axons in anterolateral columns beyond the corticospinal tracts of amyotrophic lateral sclerosis spinal cords. J Neurol Sci 331; 61-6, 2013.
- 2) Iwanaga Y, Hayashi S, et al. A case of neuromyelitis optica spectrum disorder associated with a limited cutaneous systemic sclerosis and Sjögren syndrome. Rinsho shinkeigaku 53; 695-700, 2013.
- 3) Nagara Y, Yamasaki R, Hayashi S, et al. Impaired cytoplasmic-nuclear transport of hypoxia-inducible factor-1 α in amyotrophic

- lateral sclerosis. *Brain Pathol* 23;534-46, 2013.
- 4) Saitoh BY, Yamasaki R, Havashi S, et al. A case of hereditary diffuse leukoencephalopathy with axonal spheroids caused by a de novo mutation in CSF1R masquerading as primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 19; 1367-70, 2013.
 - 5) Sonoda K, Yamasaki R, Havashi S, et al. TAR DNA-binding protein 43 pathology in a case clinically diagnosed with facial-onset sensory and motor neuronopathy syndrome: an autopsied case report and a review of the literature. *J Neurol Sci* 332; 148-53, 2013.
 - 6) Cui Y, Yamasaki R, Havashi S, et al. Extensive dysregulation of oligodendrocytic and astrocytic connexins are associated with disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neuroinflammation* 2014.Mar6;11:42. Doi:10.1186/1742-2094-11-42.
 - 7) Fujii T, Havashi S, et al. A case of adult-onset reducing body myopathy presenting a novel clinical feature, asymmetrical involvement of the sternocleidomastoid and trapezius muscles. *J Neurol Sci* 343; 206-10, 2014.
 - 8) Shiraishi W, Havashi S, Yamasaki R, et al. A case of neuromyelitis optica harboring both anti-aquaporin-4 antibodies and a pathogenic mitochondrial DNA mutation for Leber's hereditary optic neuropathy. *Mult Scler* 20; 258-60, 2014.
 - 9) Cui YW, Yamasaki R, Havashi S, et al. Decreased CCR2 and CD62L expressions on peripheral blood classical monocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Exp Neuroimmunol* 5; 92-6, 2014.
 - 10) Havashi S, Yamasaki R, et al. Impact of activated microglial morphologies on motor neuron degeneration in ALS spinal cord. *Clin Exp Neuroimmunol*: In press
 - 11) Havashi S, Okamoto K. Ectopic germinoma involving multiple midline and paramedian structures outside the pineal gland or hypophyseal region of the brain prior to tumor development. *J Neurol Sci* 358;512-4, 2015.
 - 12) Shiraishi W, Havashi S, et al. A case of synovitis, acne, pustulosis, hyperostosis, and osteitis (SAPHO) syndrome presenting with hypertrophic pachymeningitis. *J Neurol Sci*: 349; 229-31, 2015.
 - 13) Saitoh B, Havashi S, et al. A case of chronic progressive motor-dominant multiple mononeuritis associated with primary Sjögren syndrome. *Rinsho Shinkeigaku* 55: 753-8, 2015.
- [学会発表](計8件)
- 1) 林信太郎, 眞崎勝久, 崔訳文, 長柄祐子, 大八木保政, 岡本幸市, 吉良潤一: グリア性炎症からみた筋萎縮性側索硬化症の脊髄白質変性に関する形態学的検証. 第54回日本神経学会学術大会 2013.5.29~6.1 東京.
 - 2) 林信太郎, 眞崎勝久, 山崎亮, 村井弘之, 大八木保政, 岡本幸市, 吉良潤一: 孤発性筋萎縮性側索硬化症の脊髄白質に浸潤する免疫細胞群の特徴: 免疫組織化学的解析(口演). 第25回日本神経免疫学会学術集 2013.11.27~29 下関.
 - 3) 林信太郎, 山崎亮, 眞崎勝久, 村井弘之, 大八木保政, 岡本幸市, 吉良潤一: 免疫細胞群からみた孤発性筋萎縮性側索硬化症の脊髄白質変性機序の再検討. 第55回日本神経学会学術大会 2014.5.21~24 福岡.
 - 4) 林信太郎, 山崎亮, 眞崎勝久, 村井弘之, 岡本幸市, 吉良潤一: 筋萎縮性側索硬化

症におけるグリア性炎症初期像の同定: 発症早期組織と末期組織を用いた免疫病理学的検討 (口演). 第 26 回日本神経免疫学会学術集 2014.9.4~6 金沢.

- 5) Havashi S, Yamasaki R, Masaki K, Murai H, Okamoto K, Kira JI. Morphological evidences of glial inflammation that confer spinal white matter degeneration of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 25th international symposium on ALS/MND, 2014. 12.5~7 Belgium.
- 6) Shintaro Hayashi, Ryo Yamasaki, Katsuhisa Masaki, Hiroyuki Murai, Koichi Okamoto, Jun-ichi Kira. Impact of activated microglial morphologies on motor neuron degeneration in ALS spinal cord. 第 56 回日本神経学会学術大会 2015. 5.20~23 新潟
- 7) 林信太郎、眞崎勝久、山崎亮、村井弘之、岡本幸市、吉良潤一。活性化ミクログリアの形態差と脊髄内局在差が TDP-43 病理形成に与える影響の解析. 第 27 回日本神経免疫学会学術集 2015.9.15~16 岐阜.
- 8) Shintaro Hayashi, Ryo Yamasaki, Katsuhisa Masaki, Hiroyuki Murai, Koichi Okamoto, Jun-ichi Kira. A certain morphology of activated microglia, which correlates with TDP-43 pathology in ALS spinal cord. 26th international symposium on ALS/MND, 2015. 12.11~13 USA.

〔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.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

林 信太郎 (HAYASHI SHINTARO)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 90312876

(2) 研究分担者

大八木 保政 (OHYAGI YASUMASA)
愛媛大学・医学系研究科・教授
研究者番号 : 30301336

立石貴久 (TATEISHI TAKAHISA)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 50423546

河村 信利 (KAWAMURA NOBUTOSHI)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号 : 00432930
2015 年 9 月 24 日削除