

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461288

研究課題名(和文) ALS脊髄血管周皮細胞を標的とした再生許容環境の構築

研究課題名(英文) Microvascular pericytes: possible regenerative targets in ALS

研究代表者

割田 仁 (WARITA, Hitoshi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：30400245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンのほぼ選択的な変性脱落を主徴とする。成体中枢神経系が本来もつ内在性再生機転は不十分とされているが、動物モデルでは運動ニューロン変性に並行したニューロン以外の細胞には活性化や増殖が生じている。本研究では微小血管の生理的機能維持に与る周皮細胞に注目した。ALSモデルラットに新生ペリサイトを同定し、その有意な増加を明らかにした。周皮細胞選択的受容体を同モデルで解析後、周皮細胞維持因子の脊髄腔内持続投与を実施し、神経保護を示唆する結果を得た。今後、ALS病態下における新生周皮細胞・微小血管の意義、および神経変性との関連メカニズムを解明すべく解析を進める。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset neurodegenerative disease characterized by systemic loss of motor neurons. In adult brain and spinal cord, endogenous regenerative responses cannot lead to sufficient tissue repair, although neural stem/progenitor cells reside along the central neuraxis. However, non-neuronal cells such as glial cells and microvascular components are activated and proliferate by various insults including neurodegeneration.

In the present study, we examined a possible regenerative response in an ALS rat model. In contrast to controls, multiple immunohistochemistry revealed a significant increase of newborn microvascular pericytes in the ALS rat spinal cord. As compared with vehicle-treated group, intrathecal infusion of a maintaining factor for pericytes significantly augment the newborn pericytes and attenuated the loss of ventral horn neurons in the ALS rats. The pericytes may, therefore, be a novel therapeutic target in ALS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：臨床神経分子遺伝学 神経再生 神経変性 運動ニューロン

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は成人発症の神経変性疾患で、運動ニューロン変性が中核病態である。全身の骨格筋萎縮と筋力低下が進行し、発症後 3~5 年で呼吸筋麻痺にいたる致死の疾患であるが、いまだ有効な治療法がない。そのうえ診断バイオマーカーが未確立なため早期診断は困難で、診断時には多くの運動ニューロンが変性に陥っている。したがって、たとえ神経変性を抑止する治療法が将来的に開発されたとしてもなお、いったん失われた運動ニューロンの細胞体と神経回路を再生する「神経再生戦略」の必要性がきわめて高い。

運動ニューロンは大脳・脳幹から脊髄全長へと広く存在するため、単純な細胞移植による神経再生は難しい。また、ALS 変性部位、とくに脊髄は生理的にきわめて可塑性に乏しく、ニューロン新生がない部位である。実際、ALS で誘導されるのはグリア系細胞増殖ばかりで (Magnus ら, 2008)、ニューロン新生は動物モデル・ヒト共に確認されていない (Guan ら, 2007)。加えて変性ニューロン周囲ではグリア細胞増生・活性化が進行し、細胞傷害性物質や炎症性サイトカインの増加〔グリア炎症〕(Yamanaka ら, 2011)、その結果、神経再生に阻害的な微小環境が形成される (Voloboueva ら, 2011)。したがって神経再生を促進するには、グリア炎症の抑制が必要と考えられる。

家族性 ALS のおよそ 1/4 に見出される変異 Cu/Zn superoxide dismutase 遺伝子 (SOD1) を全身に過剰発現した動物モデルは選択的な脊髄運動ニューロン変性を呈し、ALS 研究の進展に大きく寄与している。近年、新しい ALS 微小環境異常として血液-脊髄関門の破綻が早期病態として本動物モデルに見出された (Garbuzova-Davis ら, 2007)。同様な複数の報告から、血管内成分の脊髄実質への漏出に続くグリア炎症が神経変性に先行していることが示された。その後、ヒト剖検例においても家族性・孤発性 ALS 血液-脊髄関門形成分子の発現減少、その破綻を示す病理学的所見とペリサイト減少が示された (Henkel ら, 2009; Winkler ら, 2013)。

中枢神経の微小血管を特徴づけるのは血液-脊髄(脳)関門の存在である。そのバリアの本態は内皮細胞同士の密着結合であるが、機能的には「内皮細胞 - ペリサイト - アストログリア - ニューロン」をひとつの単位として捉えられる〔神経-血管ユニット〕。その中でペリサイトこそが血液-脊髄関門の形成・維持・制御に必須である (del Zoppo ら, 2006)。実際、未熟な新生血管にペリサイトを動員する血小板由来増殖因子 (PDGF) -B あるいはその受容体 (PDGFR) をノックアウトしたマウスでは血液-脊髄関門形成不全により胎生致死となる。さらに同じシグナルを阻害した機能不全マウスでは、神経変性

が生じる (Bell ら, 2010)。

本研究代表者は ALS 神経再生に早くから注目し (Warita ら, 2001)、変性運動ニューロン周囲ではグリア炎症によって再生阻害因子が進行性に沈着していることを示した (Mizuno, Warita ら, 2008)。ALS 運動ニューロン変性部位における神経再生戦略においては、「血液-脊髄関門の保護と、それによるグリア炎症の抑制」が重要な鍵を握ることが想定される。

2. 研究の目的

以上のような背景のもと本研究では ALS 変性脊髄における「神経再生が生じやすい微小環境構築」をねらい、ALS 動物モデル脊髄ペリサイトの経時的病理、新生ペリサイトの同定とその神経変性との関連、介入研究による新生ペリサイトの意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

変異 SOD1 導入ラット (以下、ALS-Tg ラット) を ALS 動物モデルとして用い、発症前、発症早期、発症後期 (進行期) という 3 つの病期に分けた (各群 n=4~5)、対照として過齢一致同腹仔を用いた。まず本ラット系統を系統維持し、産仔はヒト SOD1 の exon 4 もしくは exon 5 特異的プライマーを用いて生検尾由来 DNA を試料とした polymerase chain reaction (PCR) にて遺伝子型を確認し、導入遺伝子のヘテロ接合体を上記 ALS 動物モデルとした。本モデルは既報 (Nagai ら, 2001) の通り一側後肢から他の部位へ進展する骨格筋萎縮・筋力低下を約 24 週齢で発症するため、定期的に体重を含めた表現型を確認した。

チミジンアナログを一週間全身的に持続投与して新生細胞を標識し、投与終了後 4% パラフォルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて脊髄の灌流・浸漬固定後凍結切片を作製した。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おこなった。共焦点レーザー顕微鏡下に 12 ミクロン厚切片を観察し、関心領域のデジタル画像をソフトウェアにて取得し、256 階調の TIFF ファイルとして保存した。専用の画像解析・定量・統計学的ソフトウェアを用いて比較検討した。

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、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に十分配慮し、かつ動物利用数を極力減らすようにつとめた (承認番号: 2014 医動-202、2014 医組換-174、2016 医動-106、2016 医組換-030)。

4. 研究成果

本研究では、内在性神経再生の足場となり得る血管新生に重要で、神経変性とも密接な関わりをもつペリサイトの新生増殖について、ALSモデル動物を用いて検索した。

ペリサイトは微小血管壁細胞の1つとして、血管内皮細胞とアストログリア終足間に基底膜で囲まれた細胞として同定できた。コントロールと比較してALS-Tgラットではおもな病変部位である脊髄腹側では発症前より、神経変性と並行した新生ペリサイトの有意な増加を認めた。その増加ピークは発症後・早期にあり、後期にはその程度を減じる傾向を認めた。遅れて発症後早期よりALS-Tgラット脊髄の中心管周囲においても有意なペリサイト新生増加が明らかとなった。この増加プロファイルは新生微小血管の動態と同様であった。

以上のように、本研究ではALSモデル変性病態下の脊髄にペリサイト新生促進を見出した。次に効果的なペリサイト検出マーカーを探索し、組織学的検出に適した複数のペリサイトマーカーを明らかにできた。また、ペリサイト選択的シグナル伝達受容体の*in vivo*検討をおこない、ALS-Tgラットにおいても同受容体の発現保持を認めた。

これらの成果をもとに新生微小血管との機能的連関、神経再生と神経変性における役割を解明するため介入研究を実施した。ペリサイト維持因子を発症後14日間にわたり脊髄腔内に持続投与した。溶媒投与(コントロール)群と比較して、新生ペリサイトの有意な増加、そして軽度ながら有意な運動ニューロン保護効果を得た。

今後、神経変性の抑止戦略のひとつとなり得るため、本介入研究の再現性を確認するとともに、その神経保護メカニズムについて解明を進めている。また、ALS関連変異*SOD1*発現培養ペリサイトにおける細胞生物学的解析結果が待たれる。

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 5 件)

Nisiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, Aoki M. Comprehensive targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Aging*, 査読有、53、2017年、194.e1-194.e8

Nisiyama A, Warita H, Takahashi T, Suzuki N, Nishiyama S, Tano O, Akiyama T, Watanabe Y, Takahashi K, Kuroda H,

Kato M, Tateyama M, Niihori T, Aoki Y, Aoki M. Prominent sensory involvement in a case of familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the L8V *SOD1* mutation. *Clin Neurol Neurosurg*, 査読有、150、2016年、194-196

Akiyama T, Warita H, Kato M, Nishiyama A, Izumi R, Ikeda C, Kamada M, Suzuki N, Aoki M. Genotype-phenotype relationships in familial ALS with *FUS/TLN1* mutations in Japan. *Muscle Nerve*, 査読有、54(3)、2016年、398-404

Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, Nishiyama A, Shirota M, Funayama R, Nakayama K, Mitsuhashi S, Nishino I, Aoki Y, Aoki M. Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked *hnRNPA1* mutation. *Neurol Genet*, 査読有、1(3)、2015年、e23

Izumi R, Niihori T, Takahashi T, Suzuki N, Tateyama M, Watanabe C, Sugie K, Nakanishi H, Sobue G, Kato M, Warita H, Aoki Y, Aoki M. Genetic profile for suspected dysferlinopathy identified by targeted next generation sequencing. *Neurol Genet*, 査読有、1(4)、2015年、e36

〔学会発表〕(計 12 件)

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 小野洋也, 秋山徹也, 光澤志緒, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 鈴木直輝, 青木正志, 筋萎縮性側索硬化症ラットモデル脊髄における内在性再生機転, 第16回日本再生医療学会, 2017年3月7~9日, 仙台(仙台国際センター)

四條友望, 割田 仁, 鈴木直輝, 池田謙輔, 秋山徹也, 小野洋也, 光澤志緒, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 青木正志, 筋萎縮性側索硬化症モデルラットにおけるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン受容体の異所性発現, 第16回日本再生医療学会, 2017年3月7~9日, 仙台(仙台国際センター)

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 小野洋也, 秋山徹也, 光澤志緒, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 鈴木直輝, 青木正志, Involvement of endogenous neural precursors in spinal cord of a rat model of ALS, 第57回日本神経学会学術大会, 2016年5月18~21日, 神戸(神戸コンベンションセンター)

井泉瑠美子, 割田 仁, 新堀哲也, 高橋俊明, 豎山真規, 鈴木直輝, 西山亜由美, 城田松之, 舟山 亮, 中山啓子, 三橋里美, 西野一三, 青木洋子, 青木正志, Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked *hnRNPA1* mutation, The 13th International Congress of Human Genetics, April 3-7, 2016, Kyoto, Japan (国立京都国際会館)

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 小野洋也, 秋山徹也, 鈴木直輝, 青木正志、系統的運動ニューロン変性モデル脊髄における微小血管壁細胞増殖、第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 ~ 30 日、神戸 (神戸国際会議場)

Izumi R, Warita H, Niihori T, Takahashi T, Tateyama M, Suzuki N, Nishiyama A, Shiota M, Funayama R, Nakayama K, Mitsunashi S, Nishino I, Aoki Y, Aoki M、Isolated inclusion body myopathy caused by a multisystem proteinopathy-linked *hnRNPA1* mutation、第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 20 ~ 23 日、新潟 (朱鷺メッセ)

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 小野洋也, 秋山徹也, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 鈴木直輝, 加藤昌昭, 青木正志、Pericytogenesis in spinal cord microvasculature of a rat model of ALS、第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 20 ~ 23 日、新潟 (朱鷺メッセ)

西山亜由美, 加藤昌昭, 新堀哲也, 鈴木直輝, 割田 仁, 井泉瑠美子, 青木洋子, 青木正志、Comprehensive targeted resequencing analysis in Japanese ALS patients、第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 20 ~ 23 日、新潟 (朱鷺メッセ)

四條友望, 割田 仁, 鈴木直輝, 池田謙輔, 秋山徹也, 小野洋也, 加藤昌昭, 青木正志、Chondroitin sulfate proteoglycan receptors in an ALS rat model、第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 20 ~ 23 日、新潟 (朱鷺メッセ)

秋山徹也, 鈴木直輝, 割田 仁, 加藤昌昭, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 池田謙輔, 小野洋也, 四條友望, 青木正志、Genotype-phenotype correlation with *FUS/TLS*-linked familial ALS cases in Japan、第 56 回日本神経学会学術大会、2015 年 5 月 20 ~ 23 日、新潟 (朱鷺メッセ)

割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 小野洋也, 加藤昌昭, 鈴木直輝, 船越 洋, 青木正志、成体ラット運動ニューロン変性モデル脊髄における潜在的再生能、第 37 回日本神経科学学会大会 Neuroscience 2014、2014 年 9 月 11 ~ 13 日、横浜 (パシフィコ横浜)

割田 仁, 水野秀紀, 加藤昌昭, 井泉瑠美子, 西山亜由美, 鈴木直輝, 青木正志、成体筋萎縮性側索硬化症モデル成体脊髄における潜在的 neurogenic niche、第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 21 ~ 24 日、福岡 (福岡国際会議場)

〔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.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html>

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/37acc23a2ceeffbecab9d8569a61a9f2.html>

http://researchmap.jp/warita_2012/

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