

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23111006

研究課題名(和文) 脊髄環境の恒常性維持とその破綻：グリアー神経連関からみた神経変性機序の解明

研究課題名(英文) Spinal cord environment: elucidating the mechanism of neurodegeneration through glia-neuron interaction

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 113,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では筋萎縮性側索硬化症(ALS)を病態モデルシステムとして、神経変性に対する生体応答の主役としてのグリア細胞による変性神経細胞の認識機構や生体応答機構の解明についての研究を行った。グリア細胞関連の病勢悪化因子として、自然免疫関連分子のTRIF、サイトカインTGF- $\beta$ 1を同定した。さらに、免疫・炎症修飾物質として知られるオステオポンチン(OPN)が、ALSで神経変性抵抗性の運動神経に特異的に発現し、運動神経変性に伴って周囲に放出されて神経炎症を修飾することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the mechanism for glial cells in recognition and response to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). We identified an innate immune adaptor, TRIF and astrocyte derived cytokine, TGF- $\beta$ 1 as a detrimental factor of ALS related to glial cells. In addition, we found that osteopontin (OPN), known as an immune and inflammatory mediator, expressed specifically in motor neurons resistant to degeneration in ALS, and modified neuroinflammation through secretion to neighboring glial cells.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 グリア

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの神経変性疾患研究は、神経細胞の病態に着眼した神経細胞死の機序に関する研究が主流であり、グリア細胞に見られる病的変化は神経変性に随伴する脇役としての二次的な現象であると考えられてきた。しかし、運動神経の細胞死を特徴とする神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis)に関する最近の研究などを通じて、神経変性の過程で活性化し、細胞傷害性サイトカインなどの異常放出を引き起こすグリア細胞は、神経疾患の病態に積極的に関与する細胞群として注目されている。

SOD1(Cu/Zn superoxide dismutase)は優性遺伝性 ALS の原因遺伝子であり、その病因遺伝子産物である変異 SOD1 蛋白が本来の酵素活性と関係ない未知の毒性を発揮すること (gain of toxic function) が運動神経細胞死に深く関与すると考えられている。変異 SOD1 による遺伝性 ALS モデルにおける未解決の重要な問題として、研究代表者は変異 SOD1 が毒性を発現する細胞群の同定を行ってきた。多くの遺伝性神経変性疾患と同様に、SOD1 変異を有する ALS 患者やモデルマウスでは、特定の神経細胞に細胞死がみられるにもかかわらず、変異蛋白はユビキタスに発現しており、非神経細胞における病因遺伝子産物の病的意義は不明であった。そこで山中は、どの細胞群に由来する変異 SOD1 毒性が神経変性に最も重要であるのかを解明するため、Cre-loxP システムにより細胞群特異的に除去可能な変異 SOD1 を発現する新たな ALS モデルマウス  $LoxSOD1^{G37R}$  を樹立し、運動神経、ミクログリア、アストロサイトに発現する変異 SOD1 毒性の役割を解明するため、それぞれの細胞群特異的に Cre 蛋白を発現するマウスと  $LoxSOD1^{G37R}$  マウスを交配した。

一連の研究で研究代表者は ALS の疾患進行を加速するのは運動神経に起こる病的変化ではなく、グリア細胞であるミクログリアとアストロサイトに起こる病的変化であることを証明した (*Science*, 2006; *Nat Neurosci*, 2008; *PNAS*, 2008)。また、骨髄移植を用いてミクログリアを正常化することにより、変異 SOD1 マウスの疾患進行を著明に遅延させる報告 (*Beers et al.*, *PNAS*, 2006) や正常グリア幹細胞の移植により変異 SOD1 ラットの生存期間が延長した報告 (*Lapore et al.*, *Nat Neurosci*, 2008) は、研究代表者らの研究結果とともにグ

リア細胞を正常化することによる ALS の神経細胞死が遅延することを支持している。これらの研究成果は、変性する神経細胞由来の未知のシグナルがグリア細胞の生体応答を惹起し、その応答異常が神経変性疾患の病態に深く関与することを示唆している。

このように、神経変性疾患の研究は、従来の神経細胞のみに着眼した研究のみではなく、脳内環境とその破綻という新たな概念に立脚することで、変性ニューロンに対するグリア細胞の生体応答機構の解明や、神経-グリア細胞間ネットワーク破綻による神経細胞死研究へと研究の転換点を迎えている。

## 2. 研究の目的

ALS モデルマウスの疾患進行期の病巣における、細胞群特異的な網羅的遺伝子解析から得られた遺伝子群の解析を通じて、神経細胞とグリア細胞の細胞間ネットワークの調節機構を破綻させる分子機構の同定を行う。特に、疾患進行期のグリア細胞において自然免疫関連遺伝子の異常がみられたことから、神経変性における自然免疫経路の関与について詳細な検討を行い、その鍵分子を明らかにすることを通じて、変性する神経細胞をグリア細胞が認識し応答する機構の解明を目指す。

また、抑制性サイトカインとして知られる Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) および神経炎症への関与が知られているヘルパー T 細胞の分化調節因子オステオポンチン (Osteopontin: OPN) の発現量を変化させることを通じて、グリア細胞の生体応答や炎症反応を調節することにより神経変性が遅延するかを検討する。SOD1 変異による ALS モデルは神経細胞死とグリア病態の関連を解析するうえで極めて有用なモデルであり、グリア細胞の応答様式に関して、神経変性疾患の病態や神経細胞死への理解がさらに深まるものとする。これらの研究計画を通じて、脳内環境の恒常性維持とその破綻の分子機構を明らかにし、神経変性疾患の病態への関わりを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 自然免疫経路の主要な受容体である Toll-like 受容体 (TLR) からのシグナルを伝達するアダプター分子 TRIF あるいは MyD88 を欠損した ALS マウスを作成して、発症時期、罹病期間、生存期間を比較検討する。さらに、定量 PCR 法による遺伝子発現解析や、免疫組織学的検討を通じて、疾患進行に影響をきたす病態メカニズムを明らかにする。

(2) TGF- $\beta$ 1 のグリア応答に関する役割を解析

するため、TGF- $\beta$ 1 をアストロサイト特異的に発現する GFAP-TGF- $\beta$ 1 マウスを SOD1<sup>G93A</sup> マウスと交配して、発症時期、進行速度、生存期間を検討した。また、グリア病態に影響を及ぼす分子について定量 PCR 法や、免疫組織学的手法を用いて発現解析を行った。さらに、TGF- $\beta$  シグナル阻害剤を発症後の ALS マウスに対して投与し、生存解析を行った。(3) オステオポンチン(OPN)の ALS マウスにおけるグリア細胞応答への関与について検討を行った。SOD1<sup>G93A</sup> マウスを用いて運動神経の選択的変性における OPN の発現様式を免疫組織学的手法により解析した。SOD1<sup>G93A</sup> と OPN ノックアウトマウスを交配して、病勢への影響を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) ALS における自然免疫経路の関与 : MyD88 欠失 SOD1<sup>G93A</sup>, TRIF 欠失 SOD1<sup>G93A</sup>, SOD1<sup>G93A</sup> マウスの発症、生存期間を比較したところ、MyD88 欠失は、SOD1<sup>G93A</sup> マウスの発症時期、生存期間に有意な変化を来さなかったが、TRIF 欠失 SOD1<sup>G93A</sup> マウスは、SOD1<sup>G93A</sup> マウスと比較して、発症時期は不変であったが、罹病期間が約 50%短縮し、疾患進行の著しい加速と生存期間の著明な短縮が見られた (平均生存期間, SOD1<sup>G93A</sup>: 162 日; SOD1<sup>G93A</sup>/ TRIF<sup>-/-</sup>: 138 日)。そこで、SOD1<sup>G93A</sup>/ TRIF<sup>-/-</sup> マウスの脊髄における発現分子、グリア、免疫細胞のプロファイルと比較解析した。TRIF 欠失により、CD8T 細胞、ナチュラルキラー細胞、ナチュラルキラー T 細胞といった細胞性免疫を担う免疫細胞の脊髄内浸潤の顕著な低下とケモカインの発現低下を認めた。また、TRIF 欠損 ALS マウス脊髄において Nox2 の発現が上昇し異常な形態を持つアストロサイトが増加していることを見いだした。グリア細胞における TRIF 依存性シグナルは、ケモカインの産生誘導、細胞性免疫担当細胞の脊髄内浸潤を調節し、グリア細胞の機能維持を通じて脊髄内環境を神経保護的に維持している可能性が示唆された (投稿中)。

(2) TGF- $\beta$ 1 のグリア応答に関する役割 : TGF- $\beta$ 1 は、免疫系細胞の抑制作用や神経保護作用を有する多機能性サイトカインであり、孤発性 ALS 患者の脳脊髄液で上昇することが報告されている。SOD1-ALS マウスや孤発性 ALS 患者の脊髄組織における発現を検討した結果、アストロサイトにおいて TGF-

$\beta$ 1 の発現の上昇を認めた。そこで、アストロサイト特異的に TGF- $\beta$ 1 を過剰発現する ALS マウスを作製して発症時期や罹病期間への効果を検討したところ、疾患進行が加速し生存期間が約 10 日短縮した。その病態機序を免疫組織染色、フローサイトメトリーで検討したところ、病巣におけるミクログリアの活性低下および浸潤 T 細胞数減少をきたし、変性運動ニューロンに対する保護作用が減弱したことが考えられた。さらに実験的治療として、ALS マウスに TGF- $\beta$  シグナル阻害剤を発症後より投与するとマウスの生存期間が延長した。本研究成果によって、発症後に急速な進行をとる ALS において、グリア細胞を標的とする疾患進行を遅延させる治療法開発や発症後の進行を予測する技術の開発が期待される(Endo, *Cell Rep*, 2015)。

(3) オステオポンチン (OPN) のグリア病態への関与 : ALS モデルマウス (SOD1<sup>G93A</sup>) を用いた免疫組織染色による検討から、OPN が ALS で脆弱な  $\alpha$  運動神経に強く発現することを見いだし (Misawa, *J Neurosci Res*, 2012)、ALS モデルマウスで病気の進行に伴い細胞外に放出され、粒子状構造物(OPN 細胞外沈殿)として ECM に沈着することを見出した。ALS における運動ニューロン(MN)のサブタイプ選択的変性でのオステオポンチン(OPN)の役割を解析した。OPN は、白筋 (FF)タイプ MN マーカーである MMP-9 とは異なる細胞集団に発現していた。また、赤筋及び白筋への逆行性神経トレーサー注入によるモーターユニット特異的な標識、および筋線維タイプの分別染色により、OPN は赤筋 (FR/S)タイプ MN に特異的に発現することを見出した。ALS マウス各病期の脊髄における免疫染色では、病気の進行に伴い MMP-9 陽性 MN の数が最初に減少し、その後 OPN 陽性 MN の数が減少する傾向が見られた。また ALS 発症前及び発症期において、野生型マウスではほとんど観察されない OPN 及び MMP-9 共陽性の MN (ダブルポジティブ MN) が観察された。このダブルポジティブ MN は、FF タイプ MN の変性の後に代償的にリモデリングした FR/S MN であることを確認した。OPN 欠失により ALS モデルの発症時期が遅延するが、生存期間に影響はなかった。強力な免疫・炎症修飾因子として知られる OPN は、運動神経の選択的変性に関わる分子として新たな役割を有することが判明した(Morisaki, *Sci Rep in press*)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 28 件) すべて査読あり

1. Morisaki Y, 他 4 名, Moriwaki Y, 他 5 名, Yamanaka K, \*Misawa H. Selective Expression of Osteopontin in ALS-resistant Motor Neurons is a Critical Determinant of Late Phase Neurodegeneration Mediated by Matrix Metalloproteinase-9. **Scientific Reports** *in press* (2016)
2. Endo F, Komine O, \*Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. **Clin Exp Neuroimmunol** 7: 126-138 (2016). doi: 10.1111/cen3.12309
3. Lasiene J, 他 8 名, Misawa H, Yamanaka K\*. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. **Acta Neuropathol Commun** 4: 15 (2016). doi: 10.1186/s40478-016-0286-7.
4. Chhangani D, 他 5 名, Yamanaka K\*, Mishra A. Mahogunin ring finger 1 confers cytoprotection against mutant SOD1 aggregates and is defective in an ALS mouse model. **Neurobiol Dis** 86:16-28, (2016). doi: 10.1016/j.nbd.2015.11.017
5. Komine O, Yamanaka K\*. Neuroinflammation in motor neuron disease. **Nagoya J Med Sci**, 77: 537-549, (2015).
6. Endo F, 他 8 名, Yamanaka K\*. Astrocyte-derived TGF- $\beta$ 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells. **Cell Reports**, 11:592-604 (2015). doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.053.
7. Heneka MT, 他 14 名, Yamanaka K, 他 20 名, Kummer MP. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Lancet Neurol**, 14: 388-405 (2015) doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5
8. Watanabe S, Hayakawa T, Wakasugi K, Yamanaka K\*. Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. **Cell Death Dis** 5: e1497 (2014). doi: 10.1038/cddis.2014.459.
9. Watanabe S, Ageta-Ishihara N, Nagatsu S, Takao K, Miyakawa T, Misawa H, Takahashi R, Kinoshita M, Yamanaka K\*. SIRT1 overexpression ameliorates a mouse model of SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis via HSF1/HSP70i chaperone system. **Molecular Brain** 7: 62, (2014). doi: 10.1186/s13041-014-0062-1.
10. Austin JA, 他 4 名, Yamanaka K, Hasnain SS. Aggregation resistant TDP-43 RRM domain disease mutants have increased stability and half-life. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 111: 4309-14, (2014). doi: 10.1073/pnas.1317317111.
11. Iguchi Y, 他 7 名, Yamanaka K, Takahashi R, Misawa H, 他 2 名, Sobue G. Loss of TDP-43 causes age-dependent progressive motor neuron degeneration. **Brain** 136: 1371-1382, (2013). doi: 10.1093/brain/awt029.
12. Toichi K, Yamanaka K, \*Furukawa Y. Disulfide scrambling describes the oligomer formation of superoxide dismutase (SOD1) proteins in the familial form of Amyotrophic Lateral Sclerosis. **J Biol Chem** 288: 4970-4980, (2013). doi: 10.1074/jbc.M112.414235.
13. Tsuiji H, Iguchi Y, 他 8 名, \*Yamanaka K. Spliceosome Integrity is defective in Motor Neuron Diseases, ALS and SMA. **EMBO Mol Med** 5: 221-234, (2013). doi: 10.1002/emmm.201202303.
14. Watanabe S, Kaneko K, \*Yamanaka K. Accelerated disease onset with stabilized familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked mutant TDP-43 proteins. **J Biol Chem** 288: 3641-3654, (2013). doi: 10.1074/jbc.M112.433615.
15. Mishra A, 他 5 名, Jana NR, \*Yamanaka K. E6-AP association promotes SOD1 aggregates degradation and suppresses toxicity. **Neurobiol Aging** 34:1310.e11-23, (2013) doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.016.
16. \*Misawa H, (他 3 名) Moriwaki Y, Okuda T. Osteopontin is an alpha motor neuron marker in the mouse spinal cord. **J Neurosci Res** 90: 732-742, (2012).

[学会発表] (計 100 件)

1. Yamanaka K: The role of astrocyte-derived TGF- $\beta$  in motor neuron disease. International Society for Neurochemistry Biennial Meeting,

- 2015.8. (Cairns, Australia) シンポジウム講演
2. 山中宏二 : Pathomechanisms and therapeutic directions common to motor neuron diseases. 第56回日本神経学会学術大会, ホットトピックス, 2015.5. (新潟)
  3. 山中宏二 : 筋萎縮性側索硬化症における細胞群特異的病態の解明. 日本神経学会2013年度学会賞受賞招待講演. 第55回日本神経学会学術大会, 2014.5. (福岡)
  4. Yamanaka K.: The role of microglia-immune interaction in neurodegeneration of ALS mouse model. 2013 conference of International Society for Neurochemistry, 2013. 4. (Cancun, Mexico) (招待講演)
  5. Yamanaka K.: Glial cells in experimental models of ALS: from a view of glia-immune communication. 3rd Venusberg meeting on Neuroinflammation, Bonn, Germany, 2013.3. (招待講演)
  6. Yamanaka K.: The role of glia-immune communication in Amyotrophic Lateral Sclerosis. 2012 The Korean Society for Neurodegenerative Disease Symposium (招待講演), Seoul, Korea, 2012.10.
  7. Yamanaka K., Fujimori-Tonou, N, Yamashita H. Elimination of innate immune system adaptor TRIF significantly accelerates disease progression of ALS mice. 22<sup>nd</sup> International Symposium on ALS/MND, Sydney, 2011.11.

[図書] (計 19 件)

1. 山中宏二, 最新医学社, 最新醫學 筋萎縮性側索硬化症と炎症 —神経・免疫連関の立場から—, 71(2):96-101, 2016年
2. 小峯起, 山中宏二, 中外医学社, Clinical Neuroscience, ALSとミクログリア. 33(12), 1405-1408, 2015年
3. 山中宏二, 学研メディカル秀潤社, 細胞工学, マクロファージとは似て非なる細胞ミクログリアと神経変性疾患. 33(12):1251-1255, 2014年
4. 渡邊征爾, 山中宏二, メディカルレビュー社, BRAIN MEDICAL, グリア細胞と神経変性. : 特集 神経細胞変性のメカニズム. 26(3): 237-241, 2014年
5. 山中宏二, 遠藤史人, メディカルサイエンスインターナショナル, 神経と運動単位の疾患, カンデル神経科学 (翻訳) pp305-328, 2014年
6. 遠藤史人, 山中宏二, 医歯薬出版, 医学

- のあゆみ 炎症と神経変性: 筋萎縮性側索硬化症におけるグリア病態・神経炎症. (企画: 山中宏二) 248(12): 901-906, 2014年
7. 山中宏二, 羊土社, 実験医学別冊「臓器円環による生体恒常性のダイナミクス」: 脳・脊髄環境の恒常性維持と神経疾患 31: 723-727, 2013年
  8. 山中宏二, 医歯薬出版, 医学のあゆみ 生活習慣病におけるマクロファージ: 神経変性疾患におけるミクログリア 246(11): 961-965, 2013年

[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  
研究室ホームページ:  
<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mnd/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

三澤 日出巳 (MISAWA, Hidemi)  
慶應義塾大学・薬学部・教授  
研究者番号: 80219617

### (3) 連携研究者

山下 博史 (YAMASHITA, Hirofumi)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号: 60402913

森脇 康博 (MORIWAKI, Yasuhiro)  
慶應義塾大学・薬学部・講師  
研究者番号: 00392150

### (4) 研究協力者

小峯 起 (KOMINE, Okiru)  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号: 00456211

渡邊 征爾 (WATANABE, Seiji)  
名古屋大学・環境医学研究所・助教  
研究者番号: 70633577

遠藤 史人 (ENDO, Fumito)  
名古屋大学・環境医学研究所・特任助教  
研究者番号: 10713307