

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09721

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症の病早期白質浸潤ミクログリアによる運動ニューロン逆行性変性起源

研究課題名(英文) The origin of retrograde motor neuron degeneration elicited by activated microglia in pre- or early-symptomatic spinal cord tissues from human patients with amyotrophic lateral sclerosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)の70%の症例で、脊髄錐体路(CST)と、錐体路を除いた脊髄前・側索(ALFoc)にミクログリア/マクロファージ(Mi/M)の著明な出現を認める事を我々は明らかにした。神経変性疾患でこのようなMi/Mの分布を呈する疾患はなく、ALSに特徴的といえる。本研究ではこの病理所見の意義を解明すべく、活性化後に発現が変動するMi/M上の分子に着目して患者組織を解析した。その結果、ALFocに出現するgalectin-3陽性Mi/MはTDP-43病理と有意に正相関すること、ALS発症早期の灰白質前角ではp22陽性Mi/Mが多数存在する事を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALS病態において運動ニューロン毒性を発揮する候補分子としてgalectin-3を同定したことは、神経変性疾患全体として見ても画期的な分子標的療法を開発する糸口となり得る。発症早期病巣に豊富に認められたp22は、本疾患として初の早期診断マーカー(血清や脳脊髄液を用いて測定可能と推測される)として利用できる可能性を示す。本研究の知見により、今後ALS患者が発症早期の段階で負担の少ない検査で正しく診断され、根治的な治療を受ける機会が得られれば、学術的にも社会的にも意義のある成果である。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that in 70% of ALS spinal cords, massive microglia/macrophages (Mi/M) were observed not only in the corticospinal tract (CST) but also in the anterolateral funiculus outside the CST (ALFoc). Among various neurodegenerative diseases, those Mi/M distributions in ALS spinal cords are extremely unique; however, its significance still remains to be elucidated. To address this issue, we explored various molecules expressed in activated Mi/M using spinal cord specimens from human patients with ALS in the present study. The results revealed that; (1) The number of galectin-3-immunoreactive Mi/M in the ALFoc was positively correlated with that of motor neurons with TDP-43 pathology in ALS spinal cords at terminal stage. (2) Many p22-immunopositive Mi/M were observed in the ventral grey matter with abundant motor neurons in early-symptomatic ALS spinal cords.

研究分野：神経変性疾患

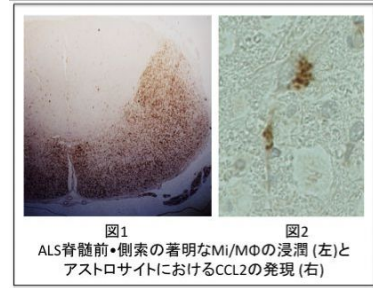
キーワード：筋萎縮性側索硬化症 脊髄前側索 galectin-3 p22phox osteopontin microglia macrophage

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは、筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者脳脊髄液中の網羅的解析により、CCL2 (単球走化性蛋白質 1) は臨床的重症度 (ALSFRS-R) と有意に相関することを報告した (Tanaka et al, J Neuropathol Exp Neurol, 2007;

Tateishi et al, J Neuroimmunol, 2010)。それに対応する病理所見について、孤発性 ALS 剖検標本の脊髄水平断全域をミクログリア/マクrophージ (Mi/M) に対する抗体 (Iba-1、CD68、Ki-M1p) を用いて検索した。この結果、脊髄の前索と側索を併せた領域 (前・側索) に広範囲かつ顕著な Mi/M の浸潤を認め (図1)、同領域には CCL2 陽性のアスト



ロサイトが多数存在 (図 2) することを報告した (Hayashi, et al. J Neurol Sci, 2013)。Mi/M の浸潤程度には症例差はあるものの、「前・側索」という分布については 7 割の症例で再現性があり、他の変性疾患においては認めなかったことから、ALS に極めて特異的な所見と考えられた。SOD1-Tg mouse の脊髄では活性化ミクログリアが様々な形態 (round, dot, amoeboid, stellate, elongated) を呈する (Lewis et al. GLIA, 2009)。この所見を参考に活性化ミクログリアの形態差と脊髄内局在差が運動ニューロンの TDP-43 病理に与える影響を、孤発性 ALS 脊髄 (ALS 7 例から 15 切片、非 ALS 5 例より 15 切片) について検討した結果、前・側索に存在する泡沫状の Iba-1 陽性細胞数のみが脊髄運動ニューロンの TDP-43 病理と有意に正相関 ($r=0.673$, $p=0.0060$) すること、さらに同領域に存在する非泡沫状細胞数は負の相関傾向 ($r=-0.506$, $p=0.054$) を示すことかを明らかにした。一方、錐体路や前角に出現する陽性細胞の中で TDP-43 病理と相関するものはなかった。この結果から、前・側索に存在する泡沫状活性化ミクログリアは神経障害性に作用し、他方、同領域の非泡沫状活性化ミクログリアは神経保護性に作用することが示唆された。泡沫状活性化ミクログリアが存在しているのは白質なので、この領域から何らかの機序で前角内の運動ニューロン細胞体に ALS 病理を生じさせている可能性があるため、私たちはこの前・側索に浸潤する泡沫状活性化ミクログリアを ALS における新たな治療標的として捉えた。ラット脊髄損傷モデルの観察では、活性化後に発現が上昇するミクログリアの遺伝子群は、障害程度と無関係に 2 つのクラスターに分かれる。1 つは損傷後 4-24 時間に発現がピークとなる

interleukin-1 β (IL-1)、interleukin-6 (IL-6)、osteopontin、calgranulin、もう一つは 72 時間-7 日の間にピークとなる C1qB、galectin-3、p22phox である。このような活性化の過程で変動する分子動態を、発症前の ALS 動物モデル組織、及び私たちが保有している発症早期の ALS 患者組織 (以下「早期病巣」) を用いて解析することで、従来のミクログリア染色 (Iba-1 など) では区別不可能であったミクログリアの中からより早期に治療標的とすべきミクログリア集団を特定できると考えた。Mi/M の顕著な浸潤がある ALS 脊髄前・側索 (図 1) には、運動ニューロンの軸索 (前根) が走行する。家族性 ALS モデル動物の検討から病態仮説の一つに dying-back mechanism (Fischer et al, Exp Neurol, 2004) が提唱されているが、ヒトでは証明されていない。以上より私たちは、ALS では脊髄前・側索に出現する活性化ミクログリアが前根の髄内線維を障害することにより逆行性に運動ニューロン変性を生じさせるという新しい仮説を立てた。一般に変性疾患の剖検組織で観察される所見は病態の終末像であり、発症前あるいは早期の病理像の観察には向いていない。一方で孤発性 ALS に関しては、現在も適切な動物モデルは作成されていない。よって動物モデルが作成されていないヒトの難治性疾患の病態解明を邁進させるための工夫として、ALS では発症後しばらくの間は運動障害が目立つ身体領域と目立たない身体領域が存在する点に注目した。私たちは progressive bulbar palsy (PBP) として発症し、上肢の運動

麻痺は臨床的に軽度～中等度、下肢の筋力は正常な時期に 突然死 (痰の窒息と推定された) した 4 症例の中枢神経標本を収集した (El Escorial 改訂診断基準で何れの症例も clinically probable ALS あるいは clinically probable laboratory supported ALS に相当)。これらの症例の延髄、頸髄は変性後期、腰髄は変性早期の病理を反映すると考えられ、同一症例の中で異なる変性カスケードを体系的に解析できる貴重な標本といえる。本研究では、この剖検試料を用いて前記の仮説を検証する。

2. 研究の目的

ALS の発症前/発症早期の脊髄に浸潤するミクログリアの発現遺伝子

神経軸索のみに活性化ミクログリアを作用させた場合に生じる神経細胞体内の病理変化
で同定した遺伝子発現を抑制する治療法の開発

以上の点について明らかにする。

3. 研究の方法

1) 発症早期の ALS 患者、発症前の家族性 ALS モデルマウスの脊髄に浸潤する活性化ミクログリアに発現する遺伝子を特定し、その遺伝子発現を抑制した際の治療効果を解析する。この目的のために細胞動態・機能を組織学的、生化学的に解析する。遺伝子発現抑制については RNA interference 法を用いる。

2) 軸索のみに活性化ミクログリア由来の炎症性サイトカイン/ケモカインを作用させた際に生じる細胞体と軸索輸送の変化を観察する。この目的のためニューロンの培養をチャンバー法で行い、lipopolysaccharide で活性化させたミクログリアが放出する mediator を作用させる。

4. 研究成果

1) 孤発性 ALS7 例とコントロール 5 例のホルマリン固定、パラフィン包埋 5 μm 厚脊髄水平断切片を用いて Iba-1、CD68、TDP-43、活性早期発現遺伝子 (4-24hr) である osteopontin (Ost)、活性後期発現遺伝子 (3-7 days) である galectin-3 (Gal3) への一次抗体を用いて免疫染色を行った。錐体路 (CST)、CST を除く前・側索 (ALF_{oc})、灰白質前角 (AH) における免疫陽性細胞と TDP-43 病理を有する運動神経細胞数を定量した。この結果、Ost 陽性細胞 (図 3) は AH に、Gal3 陽性細胞 (図 4) は ALF_{oc}/CST とに明確に別れて認められた。Iba-1/CD68 染色と Ost/Gal3 染色で認める陽性細胞 (+) の形態は一致しており、AH では点/円状、ALF_{oc}/CST では泡沫状であった。Iba-1+ に対する Ost/Gal3+ の割合は各々 58.5/36.4% であった。相関解析では ALF_{oc} に存在する Gal3+ 数のみ TDP-43 病理を有する運動神経細胞数と相関したが ($r=0.559$, $p=0.018$)、Ost+ や他の領域について相関はなかった (図 5)。以上より ALS 脊髄では Mi/M の浸潤が AH よりも ALF_{oc}/CST で先に生じる可能性が考えられた。 さらに活性後期発現遺伝子であり、かつ NADPH oxidase の構成要素の

Osteopontin-ir microglia/macrophages are predominantly present in the VGM

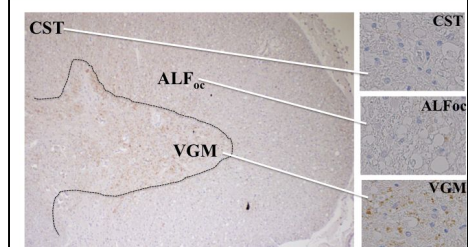


図3: Osteopontin陽性ミクログリアは主として灰白質前角に存在するがALF_{oc}やCSTには存在せず、非泡沫状の形態を有する。

Galectin-3-ir microglia/macrophages are predominantly present in the ALF_{oc} and CST

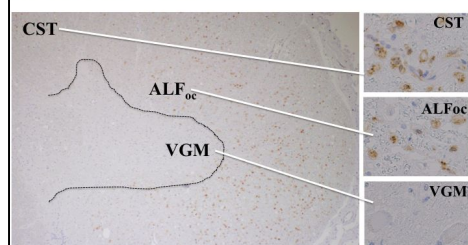


図4: Galectin-3陽性ミクログリアはALF_{oc}とCSTに存在するが脊髄灰白質には存在せず、泡沫状である。

一つ、p22 に着目し免疫染色をした結果、我々が収集した ALS 発症前病巣のうち運動神経細胞が豊富に残存している AH 内に多数の p22+ミクログリアを認めた (図 6)。

以上ヒト剖検組織でみられた所見との比較のため、当科で Red-Green マウス (CCR-RFP/CX3CR1-GFP マウス) × mSOD1 マウスを作成し解析した。この結果、脊髄より早期に脊髄前根で CX3CR1+ (常在性ミクログリア)、CCR2+ (末梢血探単球)の

活性化がみられた (図 7、CX3CR1: 前根では 8 週、灰白質は 12 週より。CCR2: 前根では 8 週、灰白質は 20 週より)。つまり浸潤の始まる領域が髄内 (ヒト) か髄外 (本マウス)かの違いはあるものの、ミクログリアは AH よりも先に前根で活性化する可能性が示唆され、ALS の変性起源を考える上で新しい知見を提供できた。これまでに ALS の脊髄における活性化ミクログリアについて、活性後の時間経過で変動する発現遺伝子に着目した研究は皆無であった。しかし本研究により活性早期発現遺伝子である Ost は運動ニューロンの存在する脊髄灰白質に、活性後期発現遺伝子 Ga13 は灰白質に隣接する前・側索にそれぞれ局在を示す事を世界で初めて発見した。さらに我々の作成した Red-Green マウス (CCR2-RFP/CX3CR1-GFP マウス) × mSOD1 マウスは ALS のグリア性炎症モデルとなる可能性を示した。

2) 次に Ga13 に着目し ALS 早期病巣の剖検時に脊髄組織から採取し凍結保存した total RNA を用いて RT-PCR 法により遺伝子発現解析を行った。

GenBank の情報を元に作成した galectin-3 exon 3 (497bp) に対するプライマーの反応性を確認したところ、20 サイクル付近で、no template control におけるプライマーダイマー生成が確認された。今後の修正点として、PCR 至適条件の再検討、プライマーの再設計が必要である。

3) 先のヒト剖検例を用いた検討で、ALS の変性起源として脊髄前根が示唆された。これについて in vitro で解析をする手段として、海馬ニューロンを用いて triple chamber neuron device により、活性化ミクログリア由来サイトカイン/ケモカインを軸索のみに作用させた際に生じる変化を検討した。同 device の microgroove の長さについて標準的な 450 μm を使用したが、MAP2、tau への一次抗体を用いた免疫染色の結果、microgroove バリア内に樹状突起が入り込む所見が確認された。このため 900 μm のものに変更して培養を行い観察 (免疫染色、annexin V/PI) したものの、軸索伸長が不十分である 14 日目に置いてニューロン死が生じた。このため現在、培養条件を見直している。4) ヒト患者剖検例の検討から Ga13 は運動ニューロン毒性を持っていると考えられた。しかし、SOD1G93A/galectin-3-/-マウスの観察では Ga13 は運動ニューロンを保護する役割が報告されており (Lerman BJ et al. Brain and Behavior, 2012)、ヒトの結果と相反する。そこで Ga13 遺伝子抑制による SOD1Tg (G93A)マウスの治療効果の検討を行った。予備実験として siRNA 導入効率を評価するために、FITC 標識した合成 siRNA を HEK-293 に導入し、24 時間後に標識細胞数をフローサイトメトリーで定量した。この結果 3 回の実験に対していずれも 30%前後と低い導入率であった。対象を HeLa 細胞に変更して行ったが、同様な低導入率であった。この原因として試薬量や播種細胞数の要因を第一に考え、24 well plate を用いて細胞数と試薬量を複数ポイントに割り振り、現在最適条件を検討している。

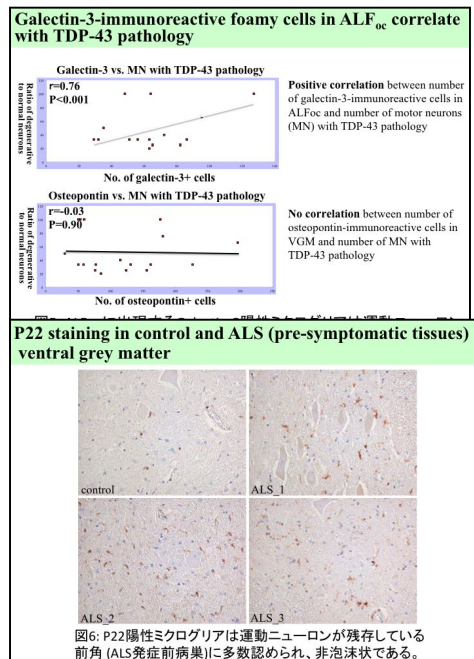


図6: P22陽性ミクログリアは運動ニューロンが残存している前角 (ALS発症前病巣)に多数認められ、非泡沫状である。

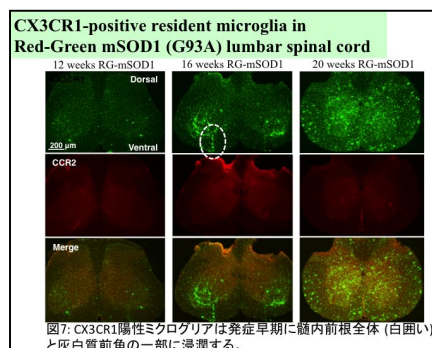


図7: CX3CR1陽性ミクログリアは発症早期に髄内前根全体 (白囲い) と灰白質前角の一部に浸潤する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14件)

- 1) Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, 他2名. Pathological study of glial inflammation in clinically pre-symptomatic spinal cords in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener** 19; 48-49: 2018.
- 2) Kobayakawa Y, Hayashi S (6番目), 他7名. Downregulation of neuronal and dendritic connexin36-made electrical synapses without glutamatergic axon terminals in spinal anterior horn cells from the early stage of amyotrophic lateral sclerosis. **Front Neurosci** 12; 894: 2018. doi: 10.3389/fnins.2018.00894. eCollection 2018.
- 3) Hayashi S (筆頭), Mashio K, Okamoto K. Case of white-eyed shunt carotid-cavernous sinus fistula mimicking optic neuritis. **Clin Exp Neuroimmunol** 10; 57-60: 2018
- 4) Hayashi F, Hayashi S (2番目), 他4名. Hopkins syndrome following the first episode of bronchial asthma associated with enterovirus D68: a case report. **BMC Neuro** 13;71: 2018. Doi: 10. 1186/s12883-018-1075-7.
- 5) Hayashi S (筆頭), Okamoto K. Pilocytic astrocytoma with anaplasia arising from the optic chiasm in a very elderly patient. **Neurology** 89;1840: 2017. Doi: 10.1212/WNL.0000000000004575.
- 6) Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, 他3名. Localizations of activated microglia/macrophages and dendritic cells are distinct in ALS spinal white matter and exert different impacts on clinical progression. **Clin Exp Neuroimmunol** 8; 361: 2017. Doi.org/10.1111/cen3.12421.
- 7) Hayashi S (筆頭), Akao N, Okamoto K. Meningeal plasma cell granuloma in the early stage of relapsing polychondritis. **Rinsho Shinkeigaku** 57;280-286: 2017. doi: 10.5692/clinicalneuro.10000975.
- 8) Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, 他3名. Early- and late-activated microglia show distinct localization and exert different impact on TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener** 17; 70-71: 2016.
- 9) Hayashi S (筆頭), Yamasaki R, 他3名. Early- and late-activated microglia show distinct localizations in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. **Clin Exp Neuroimmunol** 7; 383: 2016. doi.org/10.1111/cen3.12344.
- 10) Koge J, Hayashi S (2番目), 他8名. Morvan ' s syndrome and myasthenia gravis related to familial Mediterranean gene mutations. **J Neuroinflammation** 13; 68: 2016. Doi: 10.1186/212974-016-0533-7.
- 11) Koge J, Hayashi S (2番目), 他4名. A case of cerebratendinous xanthomatosis mimicking the clinical phenolype of mitochondrial disease with a novel frame-shift mutation (c. 43_44 del GG) in CYP27A1 gene exon 1. **Rinsho Shinkeigaku** 56;667-671. 2016.
- 12) Hayashi S (筆頭), Okamoto K, 他2名. A case of severe chronic inflammatory demyelinating polyradiculopathy with monoclonal gammopathy of undetermined significance with alternating immune class to IgM from IgA. **Rinsho Shinkeigaku** 56;593-599: 2016.
- 13) Hayashi S (筆頭), Okamoto K, 他1名. A case of HTLV-1 associated myelopathy

complicated with thymic hyperplasia. Neurological Medicine 84;595-599: 2016.

14) Saitoh BY, **Hayashi S (2 番目)**, et al. Immune-mediated spastic paraparesis accompanied with high titres of voltage-gated potassium channel complex antibodies and myokimia/fasciculation. **J Neurol Sci** 364; 133-135: 2016.

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① Hayashi S, Yamasaki R, Kira JI, et al. Detection of early glial inflammation in pre-symptomatic spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis. 第 59 回日本神経学会学術集会 (札幌), 2018.
- ② 林信太郎、山崎亮、吉良潤一、他. 孤発性筋萎縮性側索硬化症の非症候性脊髄と症候性脊髄におけるグリア炎症の免疫病理学的解析. 第 30 回日本神経免疫学会学術集会 (郡山), 2018.
- ③ Hayashi S, Okamoto K, et al. A case of white-eyed shunt carotid-cavernous sinus fistula mimicking optic neuritis. 11th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (Sydney, Australia), 2018.
- ④ Hayashi S, Yamasaki R, Kira JI, et al. Pathological study of glial inflammation in clinically pre-symptomatic spinal cords in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. 29th International Symposium on ALS/MND (Glasgow, UK), 2018.
- ⑤ Hayashi S, Ryo Yamasaki, Kira JI, et al. Distinct distribution of activated microglia/macrophages and dendritic cells in the spinal white matter of amyotrophic lateral sclerosis. 23th World Congress of Neurology 2017 (Kyoto, Japan), 2017.
- ⑥ 林信太郎, 山崎亮, 吉良潤一, 他. 筋萎縮性側索硬化症の脊髄白質では樹状細胞とマクロファージは異なる局在を示す. 第 29 回日本神経免疫学会学術集会 (札幌), 2017.
- ⑦ Hayashi S, Yamasaki R, et al. Early- and late-activated microglia show distinct localization and exert different impact on TDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. 27th International symposium on ALS/MND (Dublin, Ireland), 2016.
- ⑧ Hayashi S, Okamoto K. HTLV-1-associated myelopathy accompanied by thymic hyperplasia: A case report. 9th Congress of the Pan-Asian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (Bangkok, Thailand), 2016.
- ⑨ 林信太郎, 山崎亮, 他. Early- and late-activated microglia show distinct localizations in amyotrophic lateral sclerosis. 第 57 回日本神経学会学術集会 (神戸), 2016.
- ⑩ 林信太郎, 山崎亮, 他. 筋萎縮性側索硬化症の脊髄では活性早期ミクログリアは灰白質に、活性後期ミクログリアは白質に分布する. 第 28 回日本神経免疫学会学術集会 (長崎), 2016.

〔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: <https://www.neuro.med.kyushu-u.ac.jp>

6 . 研究組織

研究分担者

研究分担者氏名: 山崎 亮、ローマ字氏名: Yamasaki Ryo

所属研究機関名: 九州大学、部局名: 医学研究院

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 10467946

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。