

令和元年6月14日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08368

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の形態学的初発変化の特定と新規治療ターゲットの提示

研究課題名(英文)Identifying the first pathological change for the new therapeutic target in ALS

研究代表者

狩野 修 (KANO, Osamu)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20459762

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)のモデルマウスの研究において、末梢神経の炎症や脱神経が脊髄の炎症に先行してみられるといった報告がされてきたが、炎症と脱神経の経時的な変化に関しては不明であった。末梢神経の炎症と脱神経の関係を評価するために、頸髄-横隔神経-横隔膜と腰髄-坐骨神経-腓腹筋の2つのユニットを抽出し、分子病理学的手法で観察した。結果、炎症は原因ではなく脱神経によって引き起こされる二次的な反応である可能性が高いと示された。長らくALSは運動ニューロンの変性が疾患の起源であるとされてきたが、今後は神経筋接合部など末梢をターゲットとした治療が重要であると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの形態学的初発変化が脊髄より末梢神経であり、さらに脱神経が末梢神経の炎症に先行してみられることが示された。これまで、脊髄運動ニューロンの変性に対する治療がメインであったが、経時的な変化を考えると、新たな治療ターゲットとして脱神経や炎症を抑える治療の方がより効果的といえる。今後の創薬分野において、新たな方向性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Neuroinflammation is a prominent pathologic feature in the spinal cord in Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). The presence of inflammation surrounding the degenerating peripheral nerve fibers is an early event that occurs prior to the onset of motor weakness. However, we do not know whether the peripheral nerve inflammatory response initiates, or in response to, the neurodegenerative process. We evaluated denervation and accompanying inflammatory responses longitudinally in the cervical spinal cord-phrenic nerve-diaphragm motor units and lumbar spinal cord-sciatic nerve-gastrocnemius units of mSOD1Tg mice. Our result showed that denervation occurred prior to inflammation in both units. Hence, peripheral inflammation is not the cause of denervation, but a response to the neurodegeneration. We have to consider the peripheral as a therapeutic target in addition to spinal cord.

研究分野：医歯薬学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 脱神経 炎症 dying back

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

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) とは、主に中年以降に発症し全身の運動ニューロンが特異的かつ進行性に脱落をきたす神経変性疾患であり、平均 3 年半の経過で死亡する。現在、保険適応されているグルタミン酸拮抗剤のリルゾールや、フリーラジカルスカベンジャーのエダラボンの効果も非常に限定的で、筋力低下や筋萎縮に対する効果はない。これは ALS における神経変性のメカニズムが十分に解明されていないことに起因すると思われる。

これまで ALS は、脊髄の運動ニューロン変性が疾患の起源であると考えられてきた。しかし、ALS モデル動物である変異 SOD1 トランスジェニック (mSOD1Tg) マウスにおいて脱神経が脊髄運動ニューロンの脱落に先行して見られる、また末梢神経における単球やマクロファージの増殖が mSOD1Tg マウスの症状発現前の変化であるとの研究報告がされた。すなわち、mSOD1Tg マウスにおいて神経筋接合部の変化や末梢神経の炎症が脊髄運動ニューロンの脱落に先行するという dying back 現象が示唆された。しかし末梢神経における炎症が mSOD1Tg マウスにおいての最初の変化であるのか、あるいは神経筋接合部における脱神経の二次的な現象にすぎないのかは不明であった。

### 2. 研究の目的

ALS モデルマウスにおける形態学的初発変化も脊髄より末梢側であることを確認し、末梢において脱神経と炎症の経時的な変化を解明する。

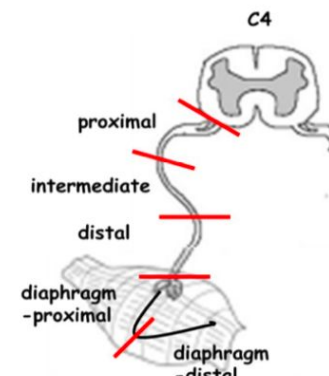
### 3. 研究の方法

本研究で使用する ALS のモデル動物である mSOD1Tg(G93A) (B6/SJL) は、生後平均 77 日目に下肢の筋力低下で発症し 130 日前後で死亡することが知られている。よって症状発現前の生後 10、20、55 日目、症状が出現する 77 日目、エンドステージである 125 日目の合計 5 時期に分けて屠殺する。定量 RT-PCR 用と病理組織用(蛍光免疫染色)に分けてそれぞれ各時期に同マウス n=6 と野生型マウス n=6 を用い、合計 n=60 とする。各個体から“横隔膜-横隔神経-頸髄(C4)”の経路と“腓腹筋-坐骨神経-腰髄(L5)”の経路の 2 つの神経系-筋肉の経路を採取し、種々の評価を行う。

定量 RT-PCR [mSOD1Tg マウス n=3×(5 時期), 野生型マウス n=3×(5 時期)合計 30 匹]: 各日齢のコントロール群を含めたマウスをイソフルランで安楽死させ、すばやく各脊髄や末梢神経、筋肉を取り出し絶凍保存する。各組織をホモジナイズしたのち RNA 抽出用のキット (RNeasy Mini Kit) を用い RNA を単離し、分光光度計を用い核酸濃度測定を行う。すべて 10 ng/ul に濃度調整を行い、インターカレーター法 (SYBR Green I 検出) によるリアルタイム PCR を行う。

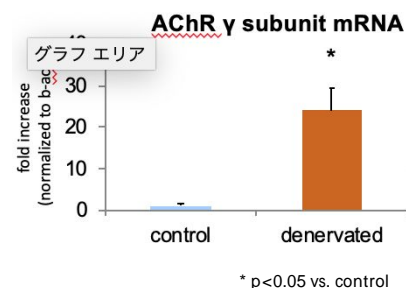
病理組織 (蛍光免疫染色用) [mSOD1Tg マウス n=3×(5 時期), 野生型マウス n=3×(5 時期)合計 30 匹]: 定量 RT-PCR 時と同様にマウスを安楽死させ、すばやく各組織を取り出しホルマリンに浸し、2 日後のショ糖に浸す。包埋剤を用いて切片を作製し凍結ミクロトームで薄切し標本作製する。ちなみに横隔神経の場合は肉眼での確認が困難なことが多く、拡大顕微鏡を用いて摘出している。

炎症の広がりを観察する目的で横隔神経を頸髄近位部から遠位部の全長を等間隔に 5 つの部位 (右図) に、坐骨神経についても、腰髄近位部から遠位部までの全長を 3 つの部位に分けて蛍光免疫染色を用いて観察する。蛍光免疫染色における定量法は末梢神経横断面の面積に占める CD68 陽性部位の面積比を計測することにより得る。このように末梢神経を数カ所に分けることにより、神経系における炎症性病変の広がり、分布、程度、発生時期が明らかとなり、同様に脱神経の分布、程度、発生時期も判明する。



### 4. 研究成果

まず、野生型マウスの坐骨神経結紮により脱神経を誘導すると、3 日後に腓腹筋における AChR サブユニットの有意な上昇がみられた (右図)。そのため AChR を脱神経の指標として用いた。AChR を用いて神経筋接合部の脱神経を確認したところ、mSOD1Tg マウスの横隔膜と腓腹筋において、両筋とも 55 日目以降に野生型マウスと比較し有意な上昇がみられ、このことから、筋肉における神経筋接合部での脱神経は 55 日目以前から始まっていることが判明した。一方炎症の評価に関しては、抗体として CD68 を用いた。mSOD1Tg マウスでは両筋とも炎症が 77 日目以降に野生型マウスと比較し有意にみられた。す



なわち脱神経が末梢神経の炎症に先行しているという結果であった。また 77 日目の横隔神経、坐骨神経をそれぞれ脊髄近位部から遠位部に至るまで 5 ヶ所に分けたところ、CD68 陽性細胞は脊髄より筋肉側でより明白であった。すなわち mSOD1Tg の末梢神経における炎症の拡がりに関しても dying back 現象が示唆された。さらに脊髄レベルでは、下肢から症状がみられる mSOD1Tg の臨床症状と同様、腰髄レベルの炎症が頸髄レベルの炎症より先に出現していた。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kano O, Tanaka K, Kanno T, Iwasaki Y, Ikeda JE. Neuronal apoptosis protein is implicated in amyotrophic lateral sclerosis symptoms. Sci Rep, 査読有, Vol.8, No.1, 2018, pp. 1-9

### 〔学会発表〕(計 2 件)

Kano O, Tanaka K, Kanno T, Iwasaki Y, Ikeda JE. Novel function of neuronal apoptosis inhibitory protein: implication for a risk factor and a prognostic marker in ALS. The 29<sup>th</sup> International Symposium on ALS/MND, Glasgow, Scotland, Dec. 8, 2018

Kano O, Tanaka K, Kanno T, Iwasaki Y, Ikeda JE. Neuronal apoptosis inhibitory protein as a risk factor and a new diagnostic biomarker in ALS. 第 59 回日本神経学会学術大会, 2018 年

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：石川 由起雄

ローマ字氏名：( ISHIKAWA, Yukio )

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：客員教授

研究者番号 ( 8 桁 ) : 30276894

(2)研究協力者

研究協力者氏名：星 秀夫

ローマ字氏名：(HOSHI, Hideo)

研究協力者氏名：瓜田 純久

ローマ字氏名：(URITA, Yoshihisa)

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。