

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09342

研究課題名(和文) 筋萎縮性側索硬化症におけるCCR2陽性単球による神経保護機構解明と移植療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathomechanisms via CCR2 positive monocyte-dependent neuroprotection in the amyotrophic lateral sclerosis model mice.

研究代表者

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

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)：私達は筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウス(mSOD1マウス)とMCP-1受容体欠損マウス(CCR2-/-マウス)を交配することで、単球遊走阻害がALSモデルマウスの病態に及ぼす影響を解析した。その結果、CCR2-/-mSOD1マウスでは早期発症し、疾患進行も促進された。通常mSOD1マウス末梢神経には発症のかなり前から末梢神経への炎症細胞浸潤を認め、変異SOD1蛋白を貪食していた。CCR2-/-mSOD1マウスではこの細胞浸潤が抑制されていた。末梢神経への炎症細胞浸潤が弱いにもかかわらず疾患進行促進が見られたことから、これらの細胞は神経保護的に作用している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the influence of monocyte migration inhibition on the pathology of ALS model mice by mating ALS model mice (mSOD1 mice) and MCP-1 receptor deficient mice (CCR2 - / - mice). As a result, CCR2 - / - mSOD1 mice developed initial sign of hind-limb weakness earlier than conventional mSOD1 mice. Conventional mSOD1 mouse had inflammatory cell infiltration into the peripheral nerve before disease onset. These inflammatory cells phagocytosed the mutant SOD1 protein. Inflammatory cell infiltration into the peripheral nerve were markedly suppressed in CCR2 - / - mSOD1 mice. Since promotion of disease progression was observed despite weak inflammatory cell infiltration into the peripheral nerve in CCR2-/-mSOD1 mice, it was strongly suggested that these inflammatory cells may act neuroprotectively.

研究分野：神経変性疾患の基礎・臨床的解析(臨床神経学)

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 変異SOD1トランスジェニックマウス マクロファージ ミクログリア CCR2

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者髄液では末梢血単球の遊走因子である MCP-1 が増加している。この事は、ALS の病態に末梢血単球が深く関与していることが強く示唆されていた。しかしながら、これまで ALS の病態と末梢血炎症細胞との関連性を解析した研究は少なく、結果も様々で議論的となっている。変異 SOD1 トランスジェニックマウス(mSOD1 マウス)は 1994 年に Gurney らにより報告された家族性 ALS のモデルマウスで、生後 12 週ごろから体重減少や後肢麻痺で発症し、20-22 週で呼吸不全を来して死亡する。このマウスでもさまざまな病態生理が提唱されているが、末梢血が病態に及ぼす影響については未解明であった。

### 2. 研究の目的

- (1)ALS モデルマウスの病態に末梢血単球が及ぼす影響の解明
- (2)疾患メカニズムに即した分子治療薬の開発

### 3. 研究の方法

(1)単球遊走因子 MCP-1 受容体 CCR2 欠損マウス(CCR2<sup>-/-</sup>マウス)と mSOD1 マウスを交配することにより、CCR2 受容体欠損 mSOD1 マウス(CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウス)を作出した。同マウスと通常 mSOD1 マウス(CCR2<sup>+/+</sup>mSOD1 マウス)の臨床経過を比較検討した。

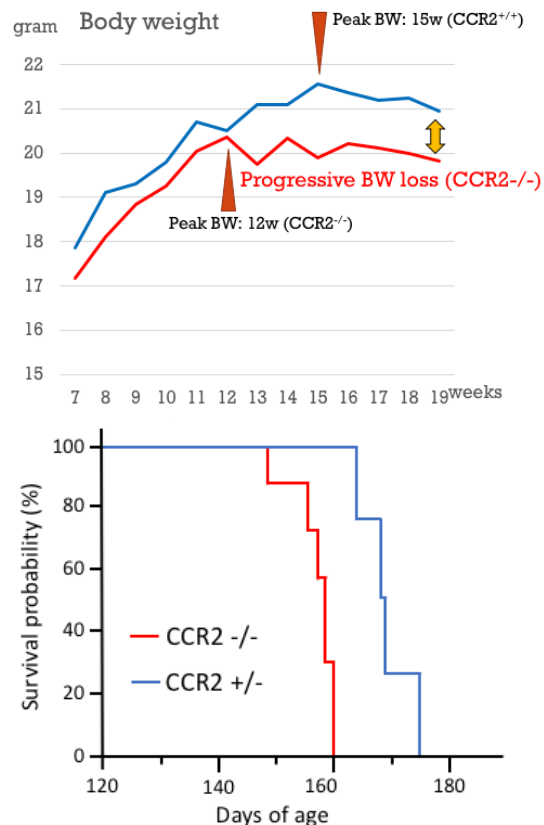
(2)mSOD1 マウスにおける原因蛋白である変異 SOD1 蛋白の神経組織への蓄積部位や順序を病理学的に検討した。

(3)CCR2 受容体の有無による蓄積部位の変化、程度などを病理学的に解析した。

### 4. 研究成果

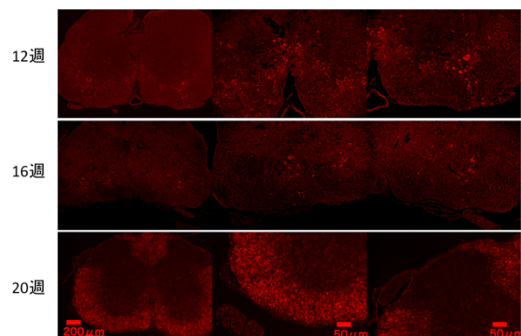
(1)CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウスは通常マウスと比較し重症化していた。体重のピークは通常 mSOD1 マウスと比較し 2 週間早く(CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 vs. mSOD1 = 14 週 vs. 16 週)、後肢の運動機能を反映するロータロッドテストのピークも 2 週間早かった(CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 vs. mSOD1 = 12 週 vs. 14 週)。マウスの総合的な運動機能評価スケールである ALS-TDI では CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウスが常に重症であることを示していた。平均生存期間も CCR2 欠損群で有意に短縮していた(CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 vs. mSOD1 = 160.0 日 vs. 174.5 日, P = 0.00454)。以上のように、単一の指標だけでなく多くの神経学的機能評価指標で CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウスにおける疾患の進行促進と生存期間短縮が示された。これらの結果は、MCP-1/CCR2 シグナルを介した末梢性免疫細胞とくに単球・マクロファージが、mSOD1 マウスにおいては神経保護的に働くことが示された。

(2)mSOD1 マウスは、実際の遺伝性 ALS 患者



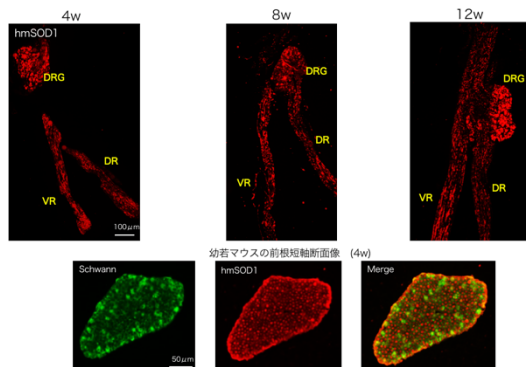
にみられる異常 SOD1 遺伝子(SOD1(G93A))のトランスジェニックマウスである。つまりこのマウスにはマウス自身の SOD1 遺伝子産物とトランスジーン由来のヒト変異 SOD1 遺伝子産物が同時に存在する。これまで、ヒト・マウス SOD1 蛋白を明確に区別できる標識がなかったので、異常蛋白がマウス神経系のどの部位から蓄積開始するか明らかでなかった。近年市販された抗体はヒト変異 mSOD1 蛋白を特異的に認識し、マウス自身の SOD1 蛋白との区別が明確にできるため、この抗体を用いて免疫染色を行った。

まず、mSOD1 マウスの主な病変部位とされる脊髄への蓄積を検討したところ、12 週ではマウスの錐体路、前角細胞、前角の髄内根に蓄積が見られた。この蓄積は週を追うごとに広がり、20 週では神経軸索や前角細胞のみならず白質にびまん性に蓄積していた。



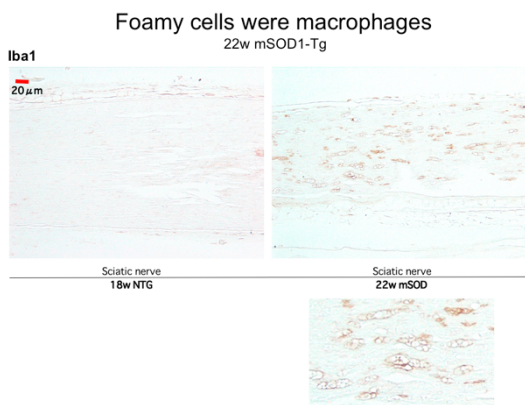
私達は、疾患早期に髄内根(=末梢神経軸索と直接の交通がある)に変異蛋白の蓄積が見られたことに着目し、さらに末梢神経(坐骨神経)への蓄積を調査したところ、坐骨神経にも

軸索を中心に著明な mSOD1 蛋白の蓄積を認めた。この蓄積は脊髄よりも早く生後 4 週からすでに認められていた。

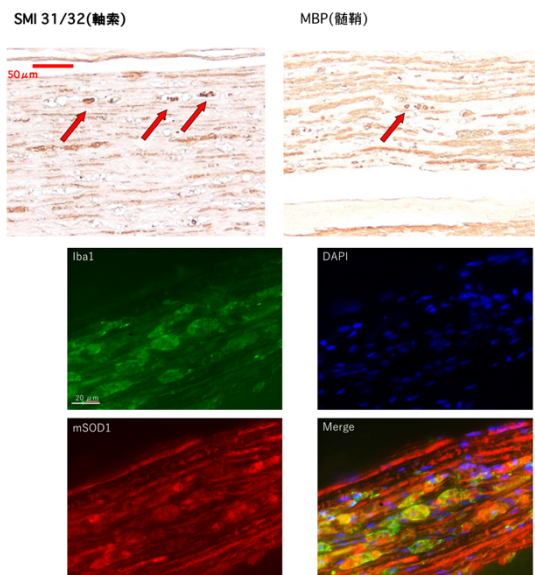


これらの結果から、①変異 SOD1 蛋白は末梢神経から蓄積が始まる、②下位運動ニューロンのみならず上位運動ニューロンの軸索にも同時に蓄積する、ということが明らかとなった。

次に、最初に蓄積が始まる末梢神経を病理学的に解析したところ、mSOD1 マウスでは野生型の正常なマウスと比較し泡沫細胞が著明に浸潤していた。免疫染色の結果、これらの細胞は末梢血由来マクロファージであることが確認された。

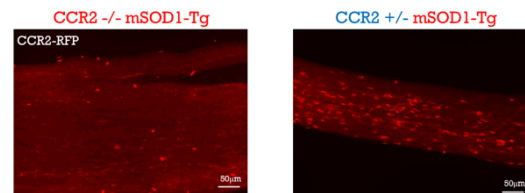


泡沫状に見える構造物の中には、髓鞘や軸索の残渣物や変異 SOD1 蛋白が確認された。

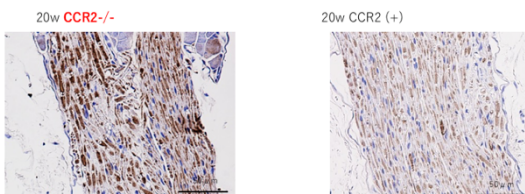


これらの結果から、マクロファージは疾患初期の末梢神経における病態に重要な役割を持っていることが示唆された。

(3) (1)と(2)の結果から、CCR2 受容体を介したマクロファージの遊走が病態に関与していると考えられたため、CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウスの神経組織を詳細に解析したところ、通常の mSOD1 マウスと比較し、確かに CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウスでは末梢神経へのマクロファージの浸潤は抑制されていた。



その一方、末梢神経組織への mSOD1 蛋白の蓄積は促進していたことから、末梢神経に浸潤

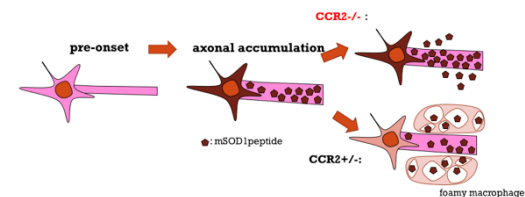


する末梢血由来泡沫マクロファージは神経保護的に働くことが強く示唆された。

これらのマクロファージは Arg1 を発現しており、神経保護的活性化(M2 偏奇)していることも確認された(データ非揭示)。

(4) 結果の検討と今後の課題：

私達は、今回の研究にて、家族性 ALS モデルマウスの神経組織では上位・下位運動ニューロン軸索へ変異 SOD1 蛋白が蓄積すること、蓄積は脊髄より末梢神経により強いこと、末梢神経には末梢血由来マクロファージが浸潤し、変異 SOD1 蛋白を貪食しクリアしていることを見出した。CCR2<sup>-/-</sup>mSOD1 マウスではこの末梢神経へのマクロファージ浸潤が抑制され、変異 SOD1 蛋白が蓄積し、疾患進行が促進されていた。これらの結果は、本マウスの疾患初期の病変の主座が末梢神経にあること、変異蛋白の蓄積は軸索から始まること、マクロファージによる変異蛋白の貪食は神経保護的に



働くことが初めて明らかとなった。

実際の孤発性 ALS 患者末梢神経におけるマクロファージの動態については、現時点で報告がないため不明であるが、末梢神経炎様の

症状で発症した ALS の症例は散見されることから、少なくとも末梢神経の炎症性病変と ALS との関連についてはコンセンサスを得られている。私達の研究で得られた知見を治療に結びつけるためには、いかにして疾患初期の末梢神経への異常蛋白蓄積を抑制させるか、いかにしてマクロファージによる異常蛋白除去を促進させるかについての方策を検討する必要がある。マクロファージは CD33 という食食抑制作用のある分子を細胞表面に発現しており、今回の研究でも末梢神経に浸潤する泡沫状マクロファージは CD33 を共発現していた。既報告では CD33 欠損アルツハイマー病モデルマウスは疾患進行抑制を認めている。私達のマウスにおいても、CD33 の機能抑制により食食効率を高め、SOD1 の蓄積を抑制できれば、ALS の新規治療法開発につながると期待している。また、末梢血マクロファージが食食に関与していることから、浸潤するマクロファージを増加させることで末梢神経における異常蛋白クリアランスを促進できると考え、遊走促進の方策を検討中である。重要な点は、いずれも末梢の免疫反応を賦活する方向の治療であるということである。従来、末梢免疫反応は疾患を悪化させると考えられてきたが、私達の研究で見られた末梢神経に浸潤するマクロファージは M2 に偏奇しており、神経保護的に作用する。抗炎症治療が必ずしも神経保護的に働くとは限らない。標的分子を絞って、ピンポイントに作用する治療により、副作用を極力減らしつつ最大限の効果が得られる治療法を開発できると考えている。

今後は、末梢神経浸潤マクロファージのさらなる機能解析およびその機能修飾により、ALS の治療薬初の disease modifying therapy の開発を継続する。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①山崎 亮、小早川 優子、白石 渉、山口 浩雄、眞崎 勝久、渡邊 充、藤田 篤史、藤井 敬之、宇根 隼人、斎藤 万有、崔 訳文、方 梅、李 広瑞、趙 奕楠、ウルファ・カメラリア・インディアサリ、吉良 潤一：筋萎縮性側索硬化症の新たな病態-ギャップ結合蛋白コネキシン機能異常や末梢神経炎症を介した病態機序の解明. グリアアセンブリ第 5 回班会議・成果報告会. 東京. 2018.1.20.

②白石 渉、山崎 亮、吉良 潤一：筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおいて CCR2 陽性末梢免疫細胞は病態保護的に働く. 第 29 回日本神経免疫学会学術集会. 札幌. 2017.10.6-7.

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

山崎 亮 (YAMASAKI, Ryo)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：10467946