

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09756

研究課題名(和文)新規疾患修飾遺伝子クロモグラニンBによる神経変性疾患共通分子病態関与の解明

研究課題名(英文)Evaluation of the role of new disease modifier variant chromogranin B in the common molecular pathology of neurodegenerative diseases

研究代表者

太田 康之(Ohta, Yasuyuki)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：20746854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規の神経変性疾患修飾遺伝子CHGBは異常構造蛋白の細胞間伝播を通じて、筋萎縮性側索硬化症(ALS)の運動ニューロン変性病態に関わる。そこで、神経変性疾患の共通病態である酸化ストレスへのCHGBの役割を解明するため、まずALSマウスにおける、経時的な酸化ストレス解析手法を確立した。具体的には、酸化ストレスを可視化できるOKDマウスとALSマウス(G93A-SOD1マウス)をかけあわせたダブルトランスジェニックマウスを作成し、in vivo imaging解析と組織学的解析により、ALSの下肢骨格筋および腰髄運動ニューロン変性における酸化ストレスの関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規の神経変性疾患修飾遺伝子CHGBは、異常構造蛋白の細胞間伝播による神経変性を通じて、様々な神経変性疾患の共通病態である酸化ストレス増強に関わることが考えられている。本研究では、代表的神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスにおける、運動ニューロンおよび骨格筋変性への酸化ストレス関与を、in vivo imagingで経時的に観察する手法を確立した。本手法は様々な神経変性疾患モデルマウスに応用することが可能であり、今後はCHGBおよび他の因子についても酸化ストレスへの関与を経時的に解析することが可能である。

研究成果の概要(英文)：A novel neurodegenerative disease-modifying gene, chromogranin B (CHGB), is involved in motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) through intercellular transmission of misfolded proteins. Therefore, in order to clarify the role of CHGB on oxidative stress, which is a common pathology of several neurodegenerative diseases, we first established the method for analyzing oxidative stress over time in ALS mice. We created the double transgenic mouse by crossing ALS mouse (G93A-SOD1 mouse) and OKD mouse, which visualizes oxidative stress, and performed in vivo imaging and histological analysis. We clarified the involvement of oxidative stress in the degeneration of lower limb skeletal muscles and lumbar spinal motor neurons of ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 疾患修飾遺伝子 クロモグラニンB 異常構造蛋白

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、神経変性疾患の病態に、異常蛋白のニューロン間伝播(プリオン仮説)の関与が報告され、アルツハイマー病(AD)ではA $\beta$ 、パーキンソン病(PD)ではシヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症(ALS)ではSOD1などの異常蛋白がエクソソームなどを介しニューロン間を伝播し、神経変性が進行することが報告されているが、その詳細は十分に判明しておらず、その神経伝播を抑制する治療法も確立していない。

クロモグラニンB(CHGB)は可溶性分泌蛋白であり、神経細胞内のtrans Golgiからシナプス小胞を介して、特に異常構造蛋白(misfolded protein)の細胞外分泌を行い、異常蛋白の細胞伝播の役割の一旦を担っている。既に、CHGBはアルツハイマー病や前頭側頭型認知症の病態に関わることが報告されている。ALSにおいては、CHGBは異常構造SOD1(misfolded SOD1)を細胞外に分泌し、ミクログリアを活性化させ運動ニューロン死を引き起こすことが報告されている(Urushitaniら、2006)。さらに申請者の太田らは、P413L変異(variant)CHGBは、細胞外分泌機能低下により、運動ニューロン内にmisfolded SOD1を蓄積させ、小胞体ストレスを引き起こすことで運動ニューロン死を引き起こすことを報告した(Ohtaら、2016)。また申請者の太田らは、CHGB発現はsex-determining region Y(SRY)の抑制コントロールにより、女性(又は雌)よりも男性(又は雄)で発現量が減少しており、日本人およびフランス系ALS患者における遺伝学的解析では、正常CHGBに比べ、P413L変異CHGBは、日本人およびフランス系女性においてALS発症年齢を早めることを報告した(Ohtaら、2016)。CHGBはSOD1以外の異常構造蛋白の細胞外分泌にも関わるため、ALSに限らず、P413L変異CHGBは女性に特に影響が大きい新規の神経変性疾患修飾遺伝子である可能性がある。また、神経変性疾患である、ALS、AD、PDの病態において、酸化ストレス関与の報告は多く、ALSでは抗酸化ストレス薬エダラボンが保険認可され注目されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患共通の病態である異常構造蛋白の神経細胞間伝播(プリオン仮説)におけるCHGBの役割を解明することを目的としている。具体的には、代表的神経変性疾患であるALS、AD及びPD患者における、性別による発症リスクおよび発症年齢についてのCHGB遺伝子変異関与についての遺伝学的解析と、CHGB変異の有無による臨床病型の違いの解析である。また、代表的神経変性疾患であるALSの運動ニューロン変性において、酸化ストレスとの関与を明らかにするため、まずALSにおける経時的な酸化ストレス解析手法の確立を行う。

### 3. 研究の方法

CHGB遺伝子解析のために、ALS、AD及びPD患者の臨床情報と遺伝子検体を収集する。また、ALSモデルマウスであるG93A-SOD1マウスと、酸化ストレス解析のため、酸化ストレスを可視化できるOKDマウスとを掛けあわせ、ダブルトランスジェニックマウスを作成し、ALS病態における酸化ストレスの経時変化の解析を、in vivo imagingによるLuciferase発光の観察により行う。OKDマウスは、酸化ストレス発生時に発現が増強されるNrf2遺伝子にLuciferase遺伝子を人工的に結合した遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスであり、酸化ストレスが増強した臓器においてNrf2発現が増強することから、Luciferase発光の増強により酸化ストレス増強の存在をin vivo imagingにより解析することが可能である。in vivo imagingによる解析は、ALS発症前、ALS発症早期、ALS発症後期で行う。また、ALS発症後期に組織学的解析を行い、酸化ストレスとALS病態における神経変性の関与を明らかにする。

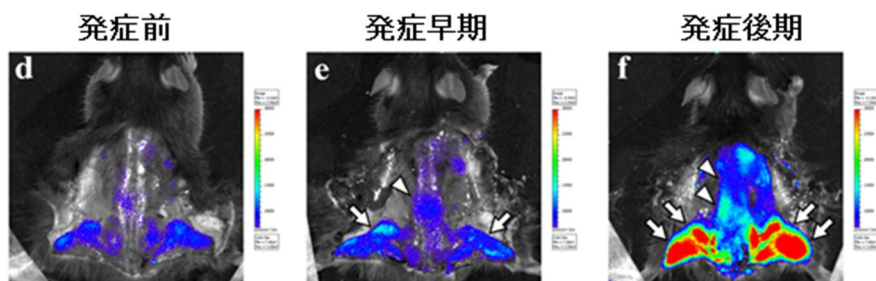
### 4. 研究成果

ALS、AD及びPD患者の臨床情報と遺伝子検体の収集は現在も継続中である。G93A-SOD1マウスと、酸化ストレス解析のため、酸化ストレスを可視化できるOKDマウスとを掛けあわせたダブルトランスジェニックマウスを作成し、本研究の実験に用いた。ダブルトランスジェニックマウスは、G93A-SOD1マウスと同様に、約90日齢で両下肢運動麻痺にて発症し、約30日齢で死亡することから、ALSの臨床病型は変わらないことを確認した。治療対象として、ALS発症時より28日間エダラボン治療を行う、エダラボン治療群を作成し、未治療群(プラセボ群)と比較することで、酸化ストレスの病態関与を明確にすることを検討した。臨床病型解析では、プラセボ群(平均139日齢)と比較し、エダラボン治療群は有意に生存期間を延長することはできなかったが(平均141日齢)Rotarod解析による運動機能評価において、ALS発症早期の運動機能低下を抑制する効果を認めた。ALS発症後期に、マウス血清を採取し、

dROM テストにより酸化ストレスを解析したところ、プラセボ群では dROM テスト数値の有意な上昇を認め、血清における酸化ストレス増強を認めたが、エダラボン治療群では dROM テスト数値の上昇は抑制されており、エダラボン治療による酸化ストレス抑制効果を認めた。in vivo imaging の解析においては、正常対照群 (OKD マウス) は Luciferase シグナルを認めなかったが、ALS モデルマウスとなるダブルトランスジェニックマウス プラセボ群では、発症前には Luciferase シグナルを認めなかったが、発症早期では、下肢骨格筋と脊椎の腰髄中心に Luciferase シグナルを認め、発症後期では下肢骨格筋と腰髄の Luciferase シグナルはより増強していた (図)。エダラボン治療群においては、発症早期および発症後期とも、下肢骨格筋と腰髄の Luciferase シグナルは著明に抑制された。以上より、ALS モデルマウスにおいて酸化ストレスは発症時より下肢骨格筋および腰髄において増強し、ALS 進行により酸化ストレスはより増強されることが判明した。次に ALS 進行時において、下肢骨格筋と腰髄を組織学的に解析した。ダブルトランスジェニックマウス プラセボ群では、下肢骨格筋は筋萎縮が顕著であり、萎縮した筋線維において Nrf2 発現増強を認めた。エダラボン治療群では筋萎縮の軽減を認め、Nrf2 発現抑制を認めた。またプラセボ群の腰髄では、運動ニューロン減少とグリア細胞増加を顕著に認め、運動ニューロンにおいて Nrf2 発現増強を認めた。エダラボン治療群では、運動ニューロン減少とグリア細胞増加の抑制を認め、運動ニューロンにおける Nrf2 発現抑制を認めた。以上の組織学的解析により、ALS モデルマウスにおいて、下肢骨格筋と運動ニューロンの変性において、酸化ストレスが強く関与していることが判明した。以上の研究成果により、代表的神経変性疾患である ALS モデルマウスにおける、運動ニューロンおよび骨格筋変性への酸化ストレス関与を、in vivo imaging で経時的に観察する手法を確立した。本手法は様々な神経変性疾患モデルマウスに応用することが可能であり、今後は CHGB および他の因子についても酸化ストレスへの関与を経時的に解析することが可能である。

### 図: ALSマウスの経時的な酸化ストレスイメージング

#### 酸化ストレス(Nrf2発現) in vivo imaging



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohta Y, Nomura E, Hatanaka N, Osakada Y, Matsumoto N, Sasaki R, Tsunoda K, Takemoto M, Tadokoro K, Hishikawa N, Wakutani Y, Yamashita T, Sato K, Omote Y, Abe K.	4. 巻 70
2. 論文標題 Female dominant association of sarcopenia and physical frailty in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 96-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2019.08.062.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nomura E, Ohta Y, Tadokoro K, Shang J, Feng T, Liu X, Shi X, Matsumoto N, Sasaki R, Tsunoda K, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Yamashita T, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Abe K.	4. 巻 415
2. 論文標題 Imaging Hypoxic Stress and the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis with Dimethyloxalylglycine in a Mice Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 31-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.06.025.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohta Y, Nomura E, Shang J, Feng T, Huang Y, Liu X, Shi X, Nakano Y, Hishikawa N, Sato K, Takemoto M, Yamashita T, Abe K.	4. 巻 97
2. 論文標題 Enhanced oxidative stress and the treatment by edaravone in mice model of amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 607-619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jnr.24368.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohta Y, Yamashita T, Hishikawa N, Sato K, Hatanaka N, Takemoto M, Doutare S, Abe K.	4. 巻 56
2. 論文標題 Affective improvement of neurological disease patients and caregivers using an automated telephone call service.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Neurosci.	6. 最初と最後の頁 74-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jocn.2018.07.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Y, Sato K, Takemoto M, Takahashi Y, Morihara R, Nakano Y, Tsunoda K, Nomura E, Hishikawa N, Yamashita T, Abe K	4. 巻 381
2. 論文標題 Behavioral and affective features of amyotrophic lateral sclerosis patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 119-125
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2017.08.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadokoro K, Ohta Y, Takahashi Y, Yamashita T, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Abe K	4. 巻 5
2. 論文標題 Familial amyotrophic lateral sclerosis of the G37V- superoxide dismutase 1 mutation with a slow disease progression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 96-98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1111/ncn3.12123">https://doi.org/10.1111/ncn3.12123</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Y, Yamashita T, Hishikawa N, Sato K, Matsuzono K, Tsunoda K, Hatanaka N, Takemoto M, Takemi T, Takamatsu K, Abe K	4. 巻 373
2. 論文標題 Potential multisystem degeneration in Asidan patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurol Sci.	6. 最初と最後の頁 216-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2017.01.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Y, Hishikawa N, Sato K, Nakano Y, Morihara R, Shang J, Takemoto M, Ohta Y, Yamashita T, Abe K.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Detecting spinal pyramidal tract of amyotrophic lateral sclerosis patients with diffusion tensor tractography.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 Epub ahead
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.11.005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shang J, Yamashita T, Nakano Y, Morihara R, Li X, Feng T, Liu X, Huang Y, Fukui Y, Hishikawa N, Ohta Y, Abe K	4. 巻 350
2. 論文標題 Aberrant distributions of nuclear pore complex proteins in ALS mice and ALS patients.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuroscience.	6. 最初と最後の頁 158-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2017.03.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ohta Y, Nomura E, Shang J, Feng T, Liu X, Shi X, Hishikawa N, Takemoto M, Yamashita T, Abe K
2. 発表標題 Therapeutic benefits of edaravone for enhanced oxidative stress in mice model of amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 Brain 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田康之、山下徹、菱川望、佐藤恒太、角田慶一郎、幡中典子、武本麻美、商敬偉、阿部康二
2. 発表標題 新規遺伝性疾患 Asidan (SCA36)におけるDAT scanの特徴
3. 学会等名 第42回日本脳神経CI学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohta Y, Nomura E, Shang J, Feng T, Nakano Y, Hishikawa N, Sato K, Takemoto M, Yamashita T, Omote Y, Abe K
2. 発表標題 Therapeutic effects of edaravone for enhanced oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis mice
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田康之、野村恵美、山下徹、馮田、佐藤恒太、武本麻美、菱川望、表芳夫、阿部康二
2. 発表標題 新規酸化ストレスイメージングによるALSへのエダラボン治療効果の検討
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田康之、山下徹、菱川望、佐藤恒太、武本麻美、表芳夫、阿部康二
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症患者の前頭葉機能評価
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita T, Nakano Y, Morihara R, Shang J, Sato K, Hishikawa N, Ohta Y, Abe K
2. 発表標題 Flow-metabolism uncoupling in the cervical spinal cord of ALS patients.
3. 学会等名 The 11th Pan Pacific Symposium on Stem Cells and Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohta Y, Soucy G, Phaneuf D, Audet JN, Gros-Louis F, Yamashita T, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Julien JP, Abe K
2. 発表標題 The pathological role of P413L variant chromogranin B as disease modifier in female amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田康之、野村恵美、商敬偉、山下徹、馮田、黄永、佐藤恒太、武本麻美、菱川望、阿部康二
2. 発表標題 ALSモデルマウス骨格筋における酸化ストレスの関与
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田康之、山下徹、菱川望、佐藤恒太、武本麻美、幡中典子、高橋義秋、中野由美子、森原隆太、阿部康二
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症における前頭葉機能低下の特徴
3. 学会等名 第8回日本認知症予防学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohta Y, Soucy G, Phaneuf D, Audet JN, Gros-Louis F, Yamashita T, Sato K, Takemoto M, Hishikawa N, Julien JP, Abe K
2. 発表標題 The role of variant chromogranin B as disease modifier in Japanese female amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田康之、山下徹、佐藤恒太、幡中典子、角田慶一郎、武本麻美、菱川望、阿部康二
2. 発表標題 新しいISCA/ALS crossroad mutation AsidanのDWEF現象.
3. 学会等名 第5回日本難病医療ネットワーク学会学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 中野由美子、孫森、山下徹、森原隆太、佐藤恒太、菱川望、太田康之、阿部康二
2. 発表標題 虚血負荷によるTDP43、FUS/TLSの発現亢進と神経細胞保護効果の関係
3. 学会等名 第17回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 太田康之、菱川望、山下徹、佐藤恒太、武本麻美、阿部康二
2. 発表標題 アルツハイマー病におけるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤変更の影響.
3. 学会等名 第7回日本認知症予防学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takemoto T, Sato T, Hishikawa N, Yamashita T, Ohta Y, Hatanaka N, Abe K
2. 発表標題 Comparison of early stage clinical symptoms, cognitive, affective and ADL functions between PDD and DLB
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阿部 康二  (Abe Koji)  (20212540)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授    (15301)	

