

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14963

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症におけるアストロサイト毒性転換機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanisms of the functional shift toward neuro-toxic astrocyte in amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)におけるアストロサイトの毒性転換機構を明らかにするため、アストロサイトの毒性転換や蓄積が示唆される自然免疫TRIF経路欠損ALSモデルマウスやアストロサイトの毒性転換が示唆される末梢免疫反応を変容させたALSモデルマウスの脊髄からアストロサイトを単離し、RNAシーケンス解析を行い、その毒性転換及び細胞死や病態に関与する発現分子の同定を行った。その結果、両者に共通して発現変動する遺伝子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのALSモデルマウスを用いた研究から運動神経の周囲で活性化したグリア細胞の異常も病態進行に関与することが示されていたが、良いマーカーや解析ツール等の少なさからアストロサイトの毒性転換機構についてはほとんど明らかになっていなかった。本研究によりその一端に関与することが示唆される遺伝子の同定ができたことは学術的に意義があり、これらの遺伝子を標的にした新規治療法の開発にもつながる社会的意義をもつ成果である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate mechanisms of the functional shift toward neuro-toxic astrocyte in amyotrophic lateral sclerosis, we performed RNA sequencing analyses with magnetic sorted astrocytes from TRIF-deficient and BALB/c background ALS model mouse spinal cords in which a detrimental effect or altered gene expressions in astrocytes were observed. We found that 54 genes including immune functional genes and cell-death-related genes altered in common.

研究分野：神経免疫学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 アストロサイト

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

運動神経の変性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)において、運動神経の異常のみならずその周囲で活性化したグリア細胞の異常も病態進行に関与していることがALSモデル動物を用いた研究により報告されている(Boillee et al., Science, 2006, Yamanaka et al., Nat Neurosci, 2008)。特に、脳内免疫を担うミクログリアについては、発現マーカーを用いた成体脳からの細胞単離技術が確立されていることや遺伝子改変マウスなどの解析ツールの多さから、多くの研究グループにより精力的に解析が行われてきた。しかし、良いマーカーや解析ツールの少なさから、アストロサイトの神経保護能及び神経傷害能を決定づける(変化させる)分子機構や発現する病態関与分子については、ほとんど明らかになっていない。そこで本研究は、アストロサイトの神経保護機能の減弱化又は毒性転換に着目し、それを制御する分子機構の解明や治療標的となりうる発現分子の同定を通じて、アストロサイトの毒性転換機構を明らかにすることで、アストロサイトを標的としたALSの新規治療法の開発を目指した。

### 2. 研究の目的

これまでの解析から、アストロサイトの毒性転換や蓄積が示唆される自然免疫TRIF経路欠損ALSモデルマウスやアストロサイトの毒性転換が示唆される末梢免疫反応を変容させたALSモデルマウスの脊髄から単離したアストロサイトを用い、その毒性転換及び細胞死や病態に関与する発現分子の同定を通して、アストロサイトの毒性転換機構を明らかにし、アストロサイトを標的としたALSの新規治療法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

アストロサイトの毒性転換や蓄積が示唆される自然免疫TRIF経路欠損ALSモデルマウスやアストロサイトの毒性転換が示唆される末梢免疫反応を変容させたALSモデルマウスの脊髄から磁気細胞分離法によってアストロサイトを単離し、次世代シーケンサーによる遺伝子発現比較解析を行う。

### 4. 研究成果

まず、成体のマウス脊髄からアストロサイトを単離するため、抗ACSA-2(Astrocyte cell surface antigen-2)抗体(Miltenyi Biotec)を用いた磁気細胞分離法を確立した(図1)。

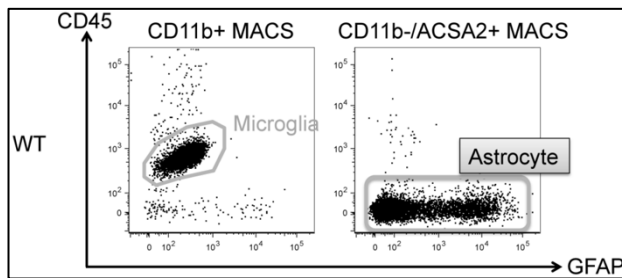


図1. 抗ACSA-2抗体を用いた磁気細胞分離法による脊髄内アストロサイトの単離(野生型マウスFACSデータ)

抗CD11b抗体による磁気細胞分離後(CD11b+ MACS)、抗ACSA-2抗体による磁気細胞分離(CD11b-/ACSA2+ MACS)によりアストロサイトを取得する。

CD45:白血球マーカー

GFAP:アストロサイトマーカー

また、これまでの研究により、自然免疫に関わる主要な分子であるToll-like受容体(TLR)の下流のシグナル経路の一つであるTRIF経路を遮断したTRIF欠損ALSモデルマウスにおいて、毒性転換した異常な形態をもつ活性化アストロサイトが脊髄灰白質内で増加することで病態進行が加速することを明らかにし、論文報告した(Komine et al., Cell death & differ, 2018)。さらには、細胞性免疫反応優位なC57BL/6マウスから液性免疫優位なBALB/cマウスに戻し交配し、ALSモデルマウスの末梢免疫反応のバランスを変化させると、病態進行が加速し、TRIF欠損ALSモデルマウスと同様、アストロサイトにおける遺伝子発現が変化することを明らかにした。そこで、アストロサイトの毒性転換に関与する遺伝子を同定するため、上記の磁気細胞分離法により、自然免疫TRIF経路欠損ALSモデルマウス(G93A/TRIFKOマウス)、ALSモデルマウス(G93Aマウス)、末梢免疫反応を変容させた2種類のALSモデルマウス(G93A(B6)、G93A(Balb)マウス)の脊髄からアストロサイトを単離し、RNA抽出後、RNAシーケンス解析を行った(n=4ずつ)。対照群としては、野生型マウスをそれぞれ用いた(n=3~4)。

まず、G93A/TRIFKOマウス由来アストロサイトにおける発現変動遺伝子について、G93Aマウス由来アストロサイトと比較解析を行ったところ、G93Aマウス由来アストロサイトに対し、1.5倍以上の発現変動のあった遺伝子(p<0.05)は、発現上昇が65遺伝子、発現低下が74遺伝子であった。また、G93A(Balb)マウス由来アストロサイトにおける発現変動遺伝子について、G93A(B6)マウス由来アストロサイトと比較解析を行ったところ、G93A(B6)マウス由来アストロサイトに対し、1.5倍以上の発現変動のあった遺伝子(p<0.05)は、発現上昇が897遺伝子、発現低下が1208遺伝子であった。次に、G93A/TRIFKOマウス由来アストロサイトおよびG93A(Balb)マウス由来アストロサイトに共通して発現変動がみられる遺伝子について比較解析したところ、発現上昇が29遺伝子、発現低下が25遺伝子であった(図2)。特に、共通して発現低下していた遺伝子は、免疫反応や免疫細胞の遊走に関与する遺伝子や細胞死に関わる遺伝子を含んでいることが判明した。本研究により同定された遺伝子の病態関与を検証することで、アストロサイト毒性転換機構の一端が明らかになると考えられる。

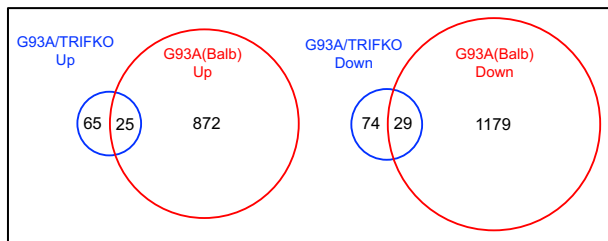


図 2. 脊髄から単離したアストロサイトの RNA-Seq 解析  
G93A/TRIFKO および G93A(Balb)において、発現変動が共通する遺伝子を同定した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Koike M, Jin S, Moriwaki Y, Endo F, Watanabe S, Uematsu S, Akira S, Uchiyama Y, Takahashi R, Misawa H, Yamanaka K. Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes. *Cell Death & Differentiation*. 2018; 25(12): 2130-2146. 査読あり
- ② Watanabe S, Komine O, Endo F, Wakasugi K, Yamanaka K. Intracerebroventricular administration of Cystatin C ameliorates disease in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurochem*, 145(1):80-89, 2018 査読あり
- ③ Yamanaka K, Komine O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci Res*, 2018;126, 31-38. 査読あり

〔学会発表〕 (計 15 件)

### 国際学会

- ① Watanabe S, Komine O, Endo F, Wakasugi K, Yamanaka K. Intracerebroventricular administration of cystatin C extended the survival time of SOD1<sup>G93A</sup> mouse model. the29th International Symposium on ALS/MND, 2018. 12. (Glasgow)
- ② Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Koike M, Jin S, Moriwaki Y, Endo F, Watanabe S, Uematsu S, Akira S, Uchiyama Y, Takahashi R, Misawa H, Yamanaka K. Innate immune adaptor TRIF confers neuroprotection in ALS mice by eliminating abnormal astrocytes. Society for Neuroscience 2018 Annual Meeting, 2018. 11. (San Diego)
- ③ Watanabe S, Nishino K, Matsuoka Y, Jin S, Komine O, Endo F, Tsuji H, Sakimura K, Mishra A, Yamanaka K. Mice deficient of C-terminal domain of TDP-43 develop age-dependent motor dysfunction via Notch1-Akt signaling pathway. 5<sup>th</sup> RNA Metabolism in Neurological Disease Conference, 2018. 11. (San Diego)
- ④ Komine O, Yamashita H. Fujimori-Tonou N, Uematsu S, Akira S, Yamanaka K. Innate immune adaptor TRIF slows disease progression of ALS mice by eliminating aberrantly activated astrocytes. 28<sup>th</sup> International symposium on ALS/MND, 2017. 12. (Boston)
- ⑤ Sugiyama M, Banno R, Taki T, Mizoguchi A, Tsunekawa T, Takagi H, Ito Y, Komine O, Yamanaka K, Arima H. Analysis of roles of glial cell subtypes in hypothalamic inflammation induced by a high fat diet. 北米肥満学会 (Obesityweek 2017), 2017. 10-11. (Washington DC)

### 国内学会

- ① Saifullah MD. Ali Bin, 小峯 起, 祖父江 顕、山中宏二、溝口博之. Behavioral characterization of APP knock-in mice model in touchscreen-based tests aiming early detection of Alzheimer's disease. 第 92 回日本薬理学会年会, 2019. 3. (大阪)
- ② 祖父江顕、遠藤史人、小峯 起、村山繁雄、山中宏二. 早期アルツハイマー病理を呈する患者脳における神経炎症関連遺伝子発現解析. 第 37 回日本認知症学会学術集会, 2018. 11. (札幌)
- ③ 杉山摩利子、坂野僚一、柳沼裕史、滝 啓吾、溝口 暁、恒川 卓、高木博史、伊藤禎浩、小峯 起、山中宏二、有馬 寛. 高脂肪食の継続投与はグリア細胞の極性変化を伴い視床下部炎症が増悪する. 第 39 回日本肥満学会. 2018. 10. (神戸)
- ④ 渡邊征爾、西野晃平、松岡由理、金 世杰、小峯 起、遠藤史人、築地仁美、崎村健司、山中宏二. TDP-43C 末端ドメイン欠損変異体は Notch1-Akt1 シグナル経路を介して加齢依存的な運動障害を引き起こす. TAR DNA binding protein-43 mutant lacking its C-terminal domain causes age-dependent motor dysfunction via Notch1-Akt signaling pathway. 第 41 回日本神経科学大会, 2018. 7. (神戸)
- ⑤ 小峯 起、大沼周平、池田早織、山中宏二. ALS モデルマウスにおける末梢免疫環境がミクログリア機能に与える影響の解明. Elucidating the influence of peripheral immune environment on microglial functions in amyotrophic lateral sclerosis mice.

第 41 回日本神経科学大会, 2018. 7. (神戸)

⑥ 張 璞, 大川裕樹, 加藤 彰, 小峯 起, 百田洋之, Robiul Bhuiyan, 大海雄介, 古川圭子, 若林俊彦, 岡島徹也, 山中宏二, 古川鋼一.

グリオシド GD3 によるグリオーマの腫瘍微小環境の制御機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017. 12. (神戸)

⑦ 渡邊征爾, 小峯 起, 遠藤史人, 山中宏二.

筋萎縮性側索硬化症におけるシスタチン C の神経保護効果. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017. 12. (神戸)

⑧ 杉山摩利子, 坂野僚一, 滝 啓吾, 溝口 暁, 恒川 卓, 高木博史, 伊藤禎浩, 小峯 起, 山中宏二, 有馬 寛.

Magnetic-activated cell sorting 法を用いた視床下部アストロサイトの単離と機能解析. 第 38 回日本肥満学会, 2017. 10. (大阪)

⑨ 小峯 起, 大沼周平, 池田早織, 山中宏二.

ALS モデルマウスのマイクログリア機能における末梢免疫の役割. 第 40 回日本神経科学大会, 2017. 7. (千葉市)

⑩ 渡邊征爾, 小峯 起, 遠藤史人, 山中宏二.

小胞体・ミトコンドリア膜間領域は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の新規治療標的である. 第 40 回日本神経科学大会, 2017. 7. (千葉市)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 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

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mnd/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※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。