

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06510

研究課題名(和文) ALS発症前に軸索変性する運動ニューロンの特徴の解明

研究課題名(英文) Approach to axon degeneration of motor neurons using pre-symptomatic ALS model mice

研究代表者

吉川 雅朗 (YOSHIKAWA, Masaaki)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：50451696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は運動ニューロンが選択的に消失する神経変性疾患であるが、運動ニューロンだけでなく非神経細胞の異常も報告されている。しかしながら、ALS発症前における非神経細胞の軸索変性に対する役割はよく分かっていない。そこで、どの細胞種がよりALS病態に影響を与えうるのか明らかにするために、各細胞種マーカーを用いて、発現変動遺伝子を解析した。軸索変性時の脊髄で、推定ミクログリア・髄膜/シュワン細胞・オリゴデンドロサイト前駆細胞が特異的に変化していた。さらに、血管系の異常が同時期に起こっていた。以上から、ALS発症前において様々な細胞種が軸索変性に関与している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの進行を抑制する因子についてはこれまでに多くの報告がある。しかしながら、発症を遅らせる因子の報告はほとんどない。発症前の軸索変性に関わる分子メカニズムが解明できれば、発症を遅らせる研究への適用が可能であり、その意義は大きい。また、ALSの初期病変に関わる因子は、患者の発症前診断・早期治療につながる情報を得られるだけでなく、運動ニューロンの軸索変性を伴うサルコペニア(加齢に伴う筋減少)のような他疾患への応用・発展も期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease characterized by the selective degeneration of motor neurons. Although the major hallmark of ALS is the motor phenotype, alterations of non-neuronal cells were also reported in ALS model mice. However, the role of non-neuronal cell impairment for axonal degeneration in pre-symptomatic ALS is still unknown. To identify which cell types were more likely to be affected by the ALS pathogenesis, we analyzed differentially expressed genes (DEGs) with known cell-type markers. The changes of putative microglia, meningeal cells / Schwann cells, and oligodendrocyte precursor cells were identified as particular abnormalities in the ALS spinal cord at postnatal day 30 (denervated neuromuscular junction). In addition, alterations in the vasculature existed prior to neuromuscular junction denervation. These results suggest that various cell types contribute to axonal degeneration in pre-symptomatic ALS.

研究分野：神経解剖学

キーワード：RNA-seq 神経血管ユニット 毛細血管密度 CGRP Runx1

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) では運動ニューロンが変性・脱落し、筋力の低下や筋萎縮が進行する。現時点で有効な治療法はなく、発症後 3~5 年で呼吸筋の麻痺のため人工呼吸器なしには生存できなくなる。こうした ALS における運動ニューロンの変性は一様には起こらず、速筋支配の運動ニューロンは早期から変性する一方で、遅筋支配の運動ニューロンはほとんど障害を受けないことが知られている。

申請者は脊髄の運動ニューロンと筋の神経ネットワークに注目し、ALS モデルマウス (G93A 変異 SOD1 遺伝子組換え (SOD1G93A) マウス) を用いて発症前の早期変化を解析し、運動ニューロンの細胞体の萎縮といった形態的な異常が見られる前に、筋で脱神経が起こることを明らかにした。さらに、支配する筋によって運動ニューロンの障害のされ方が異なり、前脛骨筋 (速筋) を支配する運動ニューロンは早期から軸索変性を起こすことを示した。

2. 研究の目的

ほとんどの ALS 患者は発症してから来院するため、国内外の ALS 研究のターゲットは発症後の進行抑制に集中している。しかし、その時点では多くの運動ニューロンがすでに変性・脱落しているため、発症後に観察された異常な現象が ALS の運動ニューロン死を引き起こす直接の原因を反映しているのか不明である。発症につながる病因を抽出するためには発症前に注目する必要があると考えられる。そこで本研究では、早期異常の一つである軸索変性した運動ニューロンに注目し解析することで、なぜ速筋支配の運動ニューロンが障害されやすいのかその特性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現変動している細胞種の解析

軸索変性が起こる時期の SOD1G93A マウスの腹側脊髄の RNA-seq 解析により、多数の遺伝子が発現変動していることが明らかになった。ALS 病態にはニューロン以外の細胞種の関与が示唆されているので、BaseSpace Correlation Engine を用いて、どの細胞種が早期に変化しているのか 1 細胞解析などから得られた脊髄の細胞種特有の遺伝子発現プロファイルやマーカー遺伝子を参考にして解析した。

(2) 神経血管ユニットの解析

遺伝子発現解析データから血管系の異常が示唆されたので、神経血管ユニットに注目し、その構成要素の早期変化を免疫組織化学染色法によって調べた。SOD1G93A マウスの脊髄前角の毛細血管密度が低下していたので、さらに、逆行性神経トレーサー (蛍光標識コレラ毒素サブユニット B) を用いて前脛骨筋 (速筋) 支配運動ニューロンとヒラメ筋 (遅筋) 支配運動ニューロンを逆行性標識し、異なる運動ニューロン群周囲の毛細血管分布密度を解析し、運動ニューロンを取り巻く血管系の環境変化が一様なのか運動ニューロン群間で異なるのか調べた。

(3) 速筋支配の運動ニューロンの解析

SOD1G93A マウスにおいて、軸索変性が起こる時期には運動ニューロンの細胞数の減少は観察されないが、運動ニューロンマーカーが変化している可能性がある。そこで、速筋支配の運動ニューロンマーカーである CGRP に注目し、その早期変化を免疫組織化学染色法により調べた。運動ニューロンにおける CGRP の発現パターンは 3 種類 (強い発現・弱い発現・発現なし) に分類できるので、ChAT (全運動ニューロンマーカー) と CGRP の蛍光二重染色を行い、それぞれのパターンの細胞数をカウントし、各運動ニューロンの割合の変化を解析した。さらに、CGRP の発現制御に関与する転写因子 Runx1 の発現を免疫組織化学染色法で調べた。

(4) Runx1 陽性細胞の可視化

速筋支配運動ニューロンの解析の過程で、野生型マウスの脊髄では観察されない Runx1 (感覚神経節・脳神経核やグリアなどに発現) が異所性に発現していた。Runx1 は転写因子であるため、核のみに発現する。そのため、免疫染色をしても細胞の形態や神経線維および投射先を観察することができない。そこで、Runx1 を発現する細胞を可視化し、Runx1 陽性細胞の形態学的および分子生物学的特徴を明らかにするため、Runx1 遺伝子のプロモーター制御下で膜移行型の蛍光タンパクを発現する (細胞膜が蛍光標識される) ノックインマウスの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 軸索変性時に遺伝子発現が変動している細胞種の特定

ALS 発症時には多くの運動ニューロンがすでに変性・脱落しているため、申請者は、ALS モデルマウスを用いて発症前の早期変化の特定を進めてきた。近年、ALS モデルマウスを用いた研究から、病因には運動ニューロン以外のミクログリアやアストロサイト、炎症性細胞など微小環境

を構成する細胞が深く関わっていることが報告されており、ALSのみならず神経変性疾患全般に認められる現象として注目されている。ALSモデルマウスの発症前の脊髄において、運動ニューロンだけでなくニューロンを取り囲む微小環境も変化している可能性が考えられ、様々な細胞種の軸索変性への関与が示唆される。そこで、どの細胞種が早期に変化しているのか、脊髄の細胞種特有の遺伝子発現プロファイルやマーカー遺伝子を用いて解析した。脊髄を構成するほとんどの細胞種（ニューロン、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、オリゴデンドロサイト前駆細胞、髄膜/シュワン細胞、血管細胞）で発現変動しており、ALS病態の進行と共にその数は増加していった。軸索変性が起こる時期特有の変化が、推定ミクログリア・髄膜/シュワン細胞・オリゴデンドロサイト前駆細胞でみられ、他の時期と比べて大きく発現変動していた。また、Gene Ontology (GO) 解析により、免疫系の異常 (CD8+ T細胞やモノサイト/マクロファージマーカーの減少) や運動ニューロンを取り巻く環境の異常 (細胞外マトリックスやコラーゲンの減少) が示唆された。

(2) 軸索変性時の神経血管ユニットの組織学的解析

一連の解析により、運動ニューロンだけでなくニューロンを取り囲む微小環境 (神経血管ユニットや細胞外マトリックス等) が大きく変化している可能性が示唆された。そこで、神経血管ユニットに注目し、その構成要素の変化を調べた。まず、毛細血管密度を脊髄の領域ごとに解析したところ、脊髄前角で毛細血管密度が低下していた。次に、障害の受けやすさが異なる前脛骨筋 (速筋) とヒラメ筋 (遅筋) を支配する運動ニューロン群 (逆行性標識により特定) 周囲の毛細血管密度を解析した。野生型マウスと SOD1G93A マウスに共通して、毛細血管密度は速筋支配運動ニューロン群周囲の方が高く、SOD1G93A マウスにおいて両方の領域で低下していた。それぞれの領域で毛細血管密度が低下したが、運動ニューロンに対する影響は一樣なのか、速筋支配運動ニューロンと遅筋支配運動ニューロンで異なる応答を示すのか検討が必要である。さらに、脊髄前角でタイトジャンクションが減少しており、血管を形成する基底膜の変性やストリング血管、ペリサイトの増加が観察された。以上から、ALSモデルマウスの脊髄において、運動ニューロンだけでなく神経血管ユニットも発症前に障害されており、その微小環境の変化は軸索変性に影響を与える可能性が高いと考える。

(3) 軸索変性時の速筋支配運動ニューロンの組織学的解析

速筋支配運動ニューロンのマーカーである CGRP の発現を 3 種類 (強い発現・弱い発現・発現なし) に分類して解析した。軸索変性が起こる時期の脊髄において、強い発現の CGRP 陽性運動ニューロンのみ細胞数の割合が減少していた。強発現 CGRP 陽性運動ニューロンの減少は軸索変性が起こる時期とかなり早期の現象であることから、強発現 CGRP 陽性運動ニューロンが ALS 病態の影響を最も受けやすい運動ニューロンである可能性が示唆される。また、CGRP 陽性運動ニューロン数の減少は、ALS 発症時においても報告されていることから、CGRP の発現低下は ALS の病態進行に関与していると考えられる。ゆえに、CGRP の発現が減少した運動ニューロンの特徴を明らかにすることは重要な課題だと考えられる。

CGRP の発現の制御に関わる Runx1 の発現を解析したところ、野生型マウスの脊髄では Runx1 の発現はみられなかったが、SOD1G93A マウスの脊髄において弱発現 CGRP 陽性運動ニューロンと共発現していた。脊髄運動ニューロンにおける Runx1 の発現は SOD1G93A マウス特有なので、ALS 病態への関与が示唆される。

(4) 軸索変性時に異所性に発現していた Runx1 陽性細胞の可視化

軸索変性が起こる時期の SOD1G93A マウスの脊髄において、Runx1 が異所性に発現していた。さらに、発現変動遺伝子のデータを用いた解析を進める中で、Regulatory motifs において、転写因子 Runx1 に関するものが上位であった。Runx1 はニューロン・ミクログリア・血管内皮細胞などでの発現が確認されている。しかしながら、転写因子であるため、免疫染色で細胞の形態を把握するのは困難である。そこで、陽性細胞で膜移行型の蛍光タンパク (細胞膜が蛍光標識される) を発現するノックインマウスの作製に着手した。

ノックインデザインおよびガイド RNA の設計を終了し、ガイド RNA の切断効率を検証した。ガイド RNA の効率的な DNA 切断 (塩基欠損) を確認することができたので、ドナー DNA の設計および構築・精製に進んだ。C57BL/6N マウスの体外受精卵に対して、ゲノム編集因子 (ガイド RNA・ドナー DNA・Cas9 タンパク質) をエレクトロポレーションにより共導入し、2 細胞期胚を偽妊娠マウスへ移植した。偽妊娠マウスが出産した仔のジェノタイプおよび挿入配列の全長を確認し、ノックインマウス (F0) を得ることができた。繁殖し、次世代マウス (F1) のジェノタイプおよび挿入配列を解析した。その結果、挿入配列の伝播が確認できたので、目的のノックインマウスを樹立することに成功した。現在、蛍光タンパク質の発現を確認中である。

今後は、細胞膜が蛍光標識される Runx1 ノックインマウスを用いて、ALS で早期に変化する Runx1 陽性細胞と、その周辺の微小環境 (特にミクログリア) はどのような変化を起こしているのか解析していく。

以上から、ALSモデルマウスにおいて運動ニューロンだけでなく神経血管ユニットを含む微小環境も発症前の早期に障害されており、その変化は軸索変性に影響を与える可能性が示唆され

た。今後は、CGRP 発現減少運動ニューロンおよび Runx1 陽性細胞を指標に、その周囲の免疫系の細胞（ミクログリア・CD8+ T 細胞など）や軸索に関わる細胞（髄膜/シュワン細胞・オリゴデンドロサイト前駆細胞など）についても解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo Masahiro, Aboshi Hirofumi, Yoshikawa Masaaki, Ogata Ayano, Murayama Ryosuke, Takei Masami, Aizawa Shin	4. 巻 63
2. 論文標題 A newly developed age estimation method based on CpG methylation of teeth-derived DNA using real-time methylation-specific PCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 54 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.20-0138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 近藤 真啓、網干 博文、吉川 雅朗、小方 彩乃、村山 良介、武井 正美、相澤 信	4. 巻 in press
2. 論文標題 リアルタイムメチル化特異的PCR による歯由来DNA のメチル化率を指標とした年齢推定法の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA多型	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 雅朗、松川 睦、大島 秀規、今田 正人、相澤 信
2. 発表標題 ALSモデルマウスの脊髄と脊髄神経節で発現変動する遺伝子の共通性と相違性の解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川 雅朗、松川 睦、大島 秀規、今田 正人、相澤 信
2. 発表標題 ALSモデルマウスを用いた感覚ニューロンの解析
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川 雅朗、松川 睦、大島 秀規、相澤 信
2. 発表標題 ALSモデルマウスを用いた脊髄神経節ニューロンの解析
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉川 雅朗、松川 睦、今田 正人、相澤 信
2. 発表標題 ALSモデルマウスを用いた脊髄微小環境の早期変化の解析
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 真啓、網干 博文、吉川 雅朗、小方 彩乃、村山 良介、武井 正美、相澤 信
2. 発表標題 歯由来DNAのメチル化を指標にした年齢推定法の検討
3. 学会等名 第88回日本法医学会学術関東地方集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 真啓、網干 博文、吉川 雅朗、小方 彩乃、村山 良介、武井 正美、相澤 信
2. 発表標題 リアルタイムメチル化特異的PCR による歯由来DNA のメチル化率を指標とした年齢推定法の検討
3. 学会等名 日本DNA多型学会第29回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川 雅朗、松川 睦、相澤 信、志賀 隆
2. 発表標題 微小重力環境マウスおよびALSモデルマウスの脊髄における遺伝子発現変動の比較解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------