

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08006

研究課題名(和文)筋萎縮性側索硬化症の病態を再現した新規モデル動物構築

研究課題名(英文)A novel model animal recapitulating ALS pathophysiology

研究代表者

高橋 祐二 (Takahashi, Yuji)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・病院・部長

研究者番号：00372392

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)：ErbB4は運動神経細胞の生存に必須であり、ErbB4の機能低下がALS共通の病態であるという仮説をin vivoで検証する為に、タモキシフェン依存性運動神経特異的コンディショナルノックアウトマウス(cKOマウス)を作製した。cKOマウスにおいては投与後5ヶ月後以降でクラスピグの出現を認めた。病理学的解析では、投与後3ヶ月目で脊髄前角運動神経細胞数の40%程度の減少を認めた。残存神経細胞はErbB4の染色性は保たれていた。ErbB4が成熟脊髄運動神経細胞の生存に必須であり、cKOマウスがALSの病態を再現したモデル動物であることを支持する成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ErbB4が運動神経細胞の生存に必須であることが明らかになり、ErbB4の機能低下性変異・ErbB4発現低下が運動神経細胞死の直接の原因になり得ることが示された。ALSの新たな病態機構の解明という学術的意義と共に、根本治療の開発に向けた創薬シーズ候補分子の同定という社会的意義も有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is hypothesized that ErbB4 is essential for the survival of motor neurons and dysfunction of ErbB4 is a common pathology of ALS. To test the hypothesis in vivo, we generated tamoxifen-dependent motor neuron-specific conditional knockout mice (cKO mice). In cKO mice, the appearance of clasping was observed 5 months after administration of tamoxifen. Pathological analysis showed a 40% decrease in the number of spinal motor neurons 3 months after administration. The residual neurons maintained the stainability of ErbB4. We have obtained results supporting that ErbB4 is essential for the survival of mature spinal motor neurons and that cKO mice are model animals that recapitulate the pathophysiology of ALS.

研究分野：臨床神経学、臨床遺伝学、分子生物学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ErbB4 コンディショナルノックアウトマウス 運動神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、全身の運動ニューロン(Motor neuron: 以下 MN)の進行性脱落を来す神経変性疾患であり、生命予後は2~4年で、現在に至るまで根本的な治療法は開発されていない。

研究代表者は2013年に、FALSの新規原因遺伝子 *ERBB4* を同定し、ALS19として報告した(1)。*ErbB4* は受容体型チロシンキナーゼであり、リガンドである Neuregulin(NRG)が結合すると二量体化し自己リン酸化を介して下流のシグナリングを司る。ALS19において認められた変異では、NRG刺激による自己リン酸化能の低下が認められ、NRG-*ErbB4* シグナリング障害がALSにおけるMN変性を惹起することが示唆された。

*ErbB4* は正常脊髄ではMNにほぼ特異的に発現している。研究代表者は孤発性ALSの剖検脊髄組織を用いた免疫組織化学的検討を行い、発症超早期から一部のMNにおける*ErbB4*の染色性が低下し、病気の進展とともに進行すること、*ErbB4*の染色性低下がTDP-43の局在異常と関連していることを見出した(2)。これらの結果から、*ErbB4*は家族性ALSだけではなく孤発性ALSの病態にも関連していることが示唆された。

*ErbB4*の機能低下がALSの共通病態であるという仮説を *in vivo* で検証するために、申請者はモデル動物の構築を試みた。*ErbB4*のホモ接合性ノックアウトマウスは胎生致死であるが(3)、脳幹神経細胞の軸索伸長異常を来す。ヘテロ接合性ノックアウトマウスは生存可能であるが、運動系の機能異常を来す。Nestinプロモーターによる脳特異的コンディショナルノックアウトマウス(cKOマウス)では、自発運動の減少と後肢の握力低下を来すが、表現型の変化は軽微であり、代償機構が働いている可能性が想定される(4)。これらの先行研究を参考にし、成人発症のALSの病態を再現するためには、①MN特異的である②発達過程の代償機構を回避する③成人発症であるの3条件を満たす*ErbB4*ノックアウトマウスの構築が必要と考えた。

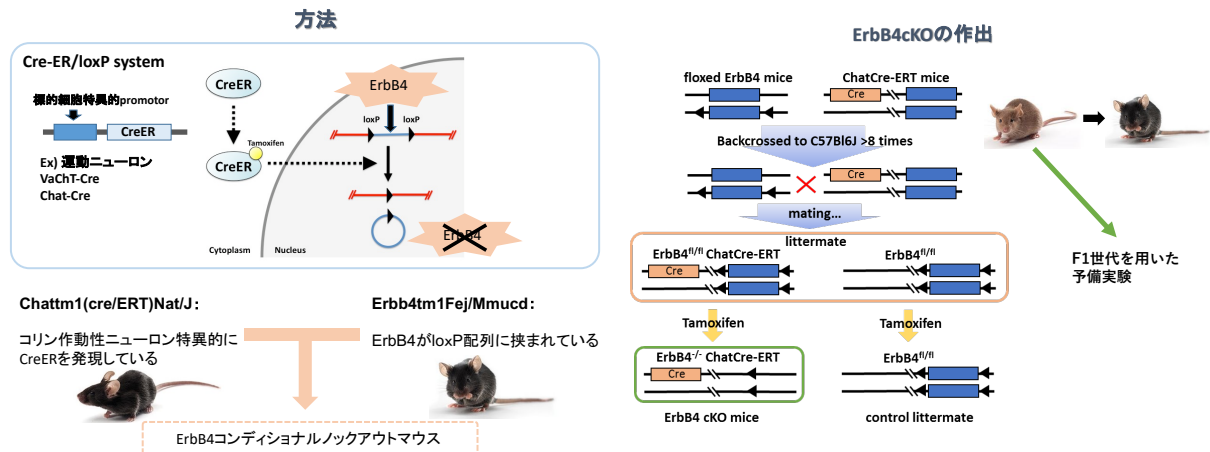
2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の病因遺伝子 *ERBB4*の運動神経細胞特異的なノックアウトマウスを作成し、*ErbB4*の発現喪失が運動神経細胞変性の直接原因であるという仮説を *in vivo* で検証する。

3. 研究の方法

Chat<sup>tm1</sup>(cre/ERT)Nat/Jマウス(ChatCre-ERTマウス)と *ErbB4*<sup>tm1</sup>Fej/Mmucdマウス(floxed *ErbB4*マウス)を掛け合わせてcKOマウスを作成し、生後8週マウスにタモキシフェン100mg/kgBWを連続5日間腹腔内投与して、行動解析・神経病理学的解析を行い、孤発性ALSのモデル動物としての妥当性を検証した(図1)。脊髄切片は10um厚100um毎に計10切片採取して、同一の運動ニューロンをカウントしないように工夫した、さらに、cKOマウス、コントロールマウスどちらか分からないようブラインドでカウントを行った。

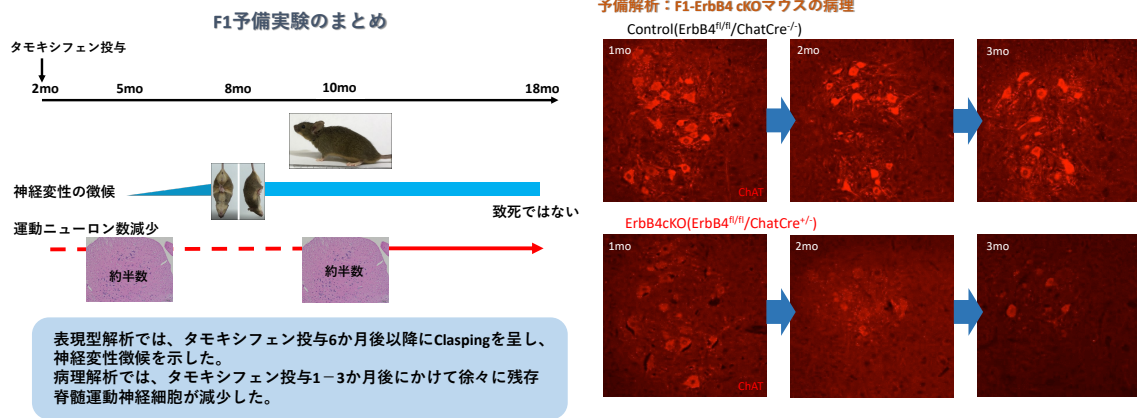
図1 *ErbB4*コンディショナルノックアウトマウスの作成



#### 4. 研究成果

①まず予備的検討として、F1世代の cK0 マウスにタモキシフェンを投与し、表現型を分析した。コントロール(Cre-ERT<sup>-/-</sup>, ErbB4 floxed/floxed)と比較して、生存期間、体重に関して明らかな差は認められなかったが、投与後5ヶ月後付近からクラスピングの出現を認めた。病理学的解析では、投与後3ヶ月において脊髄前角運動神経細胞がコントロールの5~6割まで減少していた。また同時期の投与1ヶ月では細胞数の減少は明らかではなかったものの、細胞体が縮小し周囲に間隙を認める細胞が散在していた。これらは孤発性 ALS の残存脊髄運動神経細胞でみられる所見と類似していた(図2)。

図2 F1 予備実験の表現型・病理所見



②F8世代までB6系統へのバッククロスを進め、純系の cK0 マウスの作製を完了した。実際に生後8週齢のマウスにタモキシフェン100mg/kgを投与して、1年後まで追跡した。F1における観察と同様クラスピングの出現を認めた。病理学的には、コントロールに比して40%程度の脊髄運動神経細胞の減少を認めた(図3)。残存神経細胞はErbB4陽性であり、TDP-43の細胞内局在異常も認められなかった(図4)。

図3 F8における運動神経細胞脱落所見

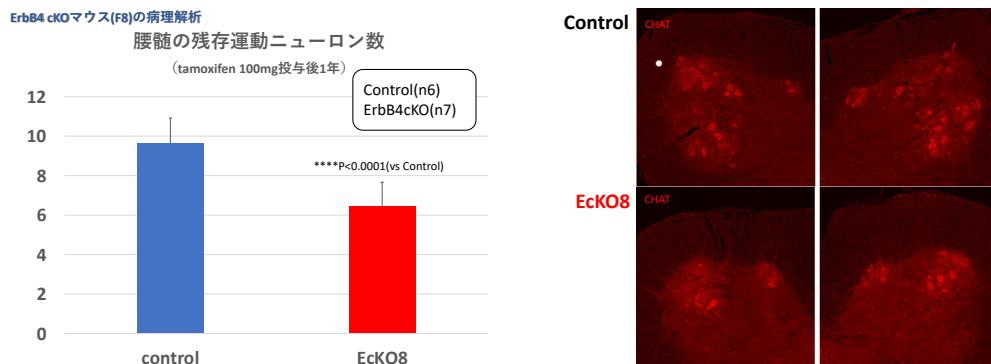
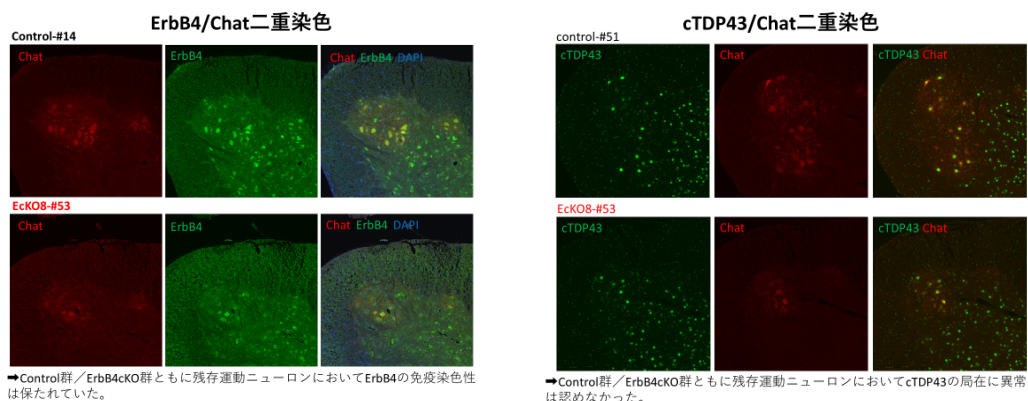


図4 脊髄運動神経細胞におけるErbB4・TDP-43の発現



本研究により、脊髄運動神経細胞の生存には ErbB4 が必須であることを裏付ける結果が得られ

た。特に、ノックアウトしてから3ヶ月かけて徐々に運動神経細胞の脱落が進行している知見が得られており、ALSの神経変性を再現している可能性があると考えられる。今後は変性過程における運動神経細胞に焦点を当て、Bunina小体やTDP-43の細胞内局在異常などALSの病理学的特徴の有無を分析すると共に、ErbB4ノックアウトによる下流のシグナリング変化の分析から、ErbB4依存性の運動神経細胞死の分子機構を明らかにする。

#### 引用文献

1. Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, et al. ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet.* 2013;93(5):900-5.
2. Takahashi Y, Uchino A, Shioya A, et al. Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology.* 2019;39(4):268-78.
3. Gassmann M, Casagrande F, Orioli D, et al. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature.* 1995;378(6555):390-4.
4. Golub MS, Germann SL, Lloyd KC. Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res.* 2004;153(1):159-70.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Takahashi Yuji, Uchino Akiko, Shioya Ayako, Sano Terunori, Matsumoto Chihiro, Numata Uematsu Yurika, Nagano Seiichi, Araki Toshiyuki, Murayama Shigeo, Saito Yuko	4. 巻 39
2. 論文標題 Altered immunoreactivity of ErbB4, a causative gene product for ALS19, in the spinal cord of patients with sporadic ALS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 268 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12558	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 Sugiyama Atsuhiko, Sato Noriko, Kimura Yukio, Shigemoto Yoko, Suzuki Fumio, Morimoto Emiko, Takahashi Yuji, Matsuda Hiroshi, Kuwabara Satoshi	4. 巻 401
2. 論文標題 Exploring the frequency and clinical background of the “zebra sign” in amyotrophic lateral sclerosis and multiple system atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Neurological Sciences	6. 最初と最後の頁 90 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2019.04.032	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuka Hama, Hidetoshi Date, Hiroyuki Ishiura, Jun Mitsui, Koichiro Doi, Jun Yoshimura, Shinichi Morishita, Shoji Tsuji, Hidehiro Mizusawa, Yuji Takahashi
2. 発表標題 Implication of rare variants in causative genes for Charcot-Marie-Tooth disease in patients clinically diagnosed as ALS
3. 学会等名 30th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------