

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17010

研究課題名（和文）電気シナプスを介する運動神経興奮性制御機構の解明と同シナプス回復によるALS治療

研究課題名（英文）Elucidation of excitability control in motor neuron via electrical synapse and exploration of treatment for ALS by synaptic recovery

研究代表者

小早川 優子（KOBAYAKAWA, YUKO）

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：40733788

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症（ALS）のヒト剖検例及びモデルマウスの腰髄では、神経細胞間の情報伝達を担う電気シナプスを形成するコネキシン36（Cx36）の発現が低下していることが報告されている。本研究では、Cx36の脱落がALSの運動神経変性にどのように関与しているか、運動神経変性を抑制するための治療標的となりうるかを、ALSモデルマウスを用いて検討した。その結果、脊髄の運動ニューロンではCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ（CaMK）サブクラスのうちCaMK<sub>II</sub>及びCaMK<sub>IV</sub>がCx36の可塑性を調整し、Cx36が形成する電気シナプスを回復するための標的候補となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは未だ病態の全容が解明されておらず、進行抑制効果が証明された治療薬が近年実用化しているものの、根治的治療法または症状の改善が得られる治療法のない難病である。本研究の結果、ALSの治療標的となりうる新たな候補標的が示唆された。さらなる解析を続けることで、従来の治療薬とは異なる作用機序の治療薬開発につながる可能性がある。またCx36が形成する電気シナプスは中枢神経系に広く発現しており、外傷・てんかん・虚血・炎症への関与が示唆されている。本研究結果は、これらの疾患に関しても新たな病態解明や治療薬開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that the expression of connexin 36 (Cx36), which forms electrical synapses responsible for communication between neurons, were reduced in lumbar cords of human autopsy cases of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and ALS model mouse. In this study, we investigated how Cx36 loss is involved in motor neuronal degeneration in ALS and whether it can be a therapeutic target for ALS using model mice. Our results suggested that CaMKII and CaMKIV regulate the plasticity of Cx36 in the motor neurons of lumbar cords and may be potential targets for restoring the electrical synapses formed by Cx36.

研究分野：神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 電気シナプス コネキシン36

### 1. 研究開始当初の背景

神経細胞間の情報伝達機構には、神経伝達物質がシナプス後膜の受容体に結合する化学シナプスと、神経細胞膜上の Connexin (Cx) 蛋白が形成する gap junction を通じてイオンや小分子が直接細胞間を移動する電気シナプスがあり、電気シナプスは抑制性または興奮性の化学シナプスと共存するか、共存せずに単独で存在する。電気シナプスを形成する Cx 蛋白の代表は Cx36 であり、隣接する神経細胞間での同期した電気活動 (electrical coupling) を担う。筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) モデルマウスである変異 SOD1 (G93A) トランスジェニックマウス (SOD1<sup>G93A</sup> マウス) の腰髄前角では、単独もしくは抑制性の化学シナプスと共存する Cx36 の発現が病初期から低下していること、ヒト剖検例の脊髄においても Cx36 の発現が低下していることが報告されており、電気シナプスの減少が、運動神経の変性に何等かの影響を及ぼしていると考えられる。

### 2. 研究の目的

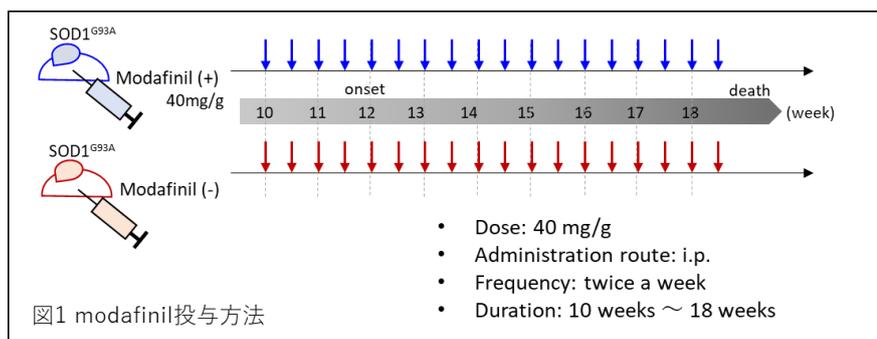
本研究の目的は、脊髄で Cx36 が形成する電気シナプスの脱落が ALS の運動神経変性にどのように関与しているか、及び ALS の運動神経変性を抑制するための治療標的となりうるかを検討することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) electrical coupling を増強する薬剤 (modafinil) の効果の検討

electrical coupling を増強することが知られてる modafinil を SOD1<sup>G93A</sup> マウスに投与し、運動神経変性が抑制されるかどうかを観察した。

具体的には図 1 のように、SOD1<sup>G93A</sup> マウスに 10 週齢 (発症期) から 18 週齢 (進行期) まで、週に 2 回、40  $\mu$ g/g の modafinil または溶媒のみを腹腔内投与し、体重変化、Hand grip、Rotarod performance、生存期間を比較した。



#### (2) Cx36 の制御機構の検討

Cx36 の可塑性を調整する分子として、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CaMK II) に着目し、脊髄前角の運動ニューロンに発現する Cx36 と CaMK II サブタイプの関係、及び SOD1<sup>G93A</sup> マウスにおける CaMK II の発現変化を病理学的に検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) modafinil の効果の検討

Modafinil の投与は Cx36 以外に Cx30 の発現に影響することが知られているため、今回の投与方法 (40  $\mu$ g/g の週 2 回腹腔内投与) が Cx30 の発現に影響がしないことを確認した。

modafinil 投与群 (N=10) と非投与群 (N=11) について、体重減少の経過 (図 2-(1))、Rotarod performance (図 3-(1)) 及び Hand grip (図 3-(2)) の低下は modafinil 投与群でやや遅れる傾向にあったが、有意な差は認めなかった。また生存期間についても、投与群 (163  $\pm$  21.2day) と非投与群 (161  $\pm$  12.0day) で有意な差を認めなかった (図 4)。以上より、今回の投与方法で

は、modafinil による運動神経変性抑制効果は得られず、投与量や投与方法の改善が必要と考えられた。

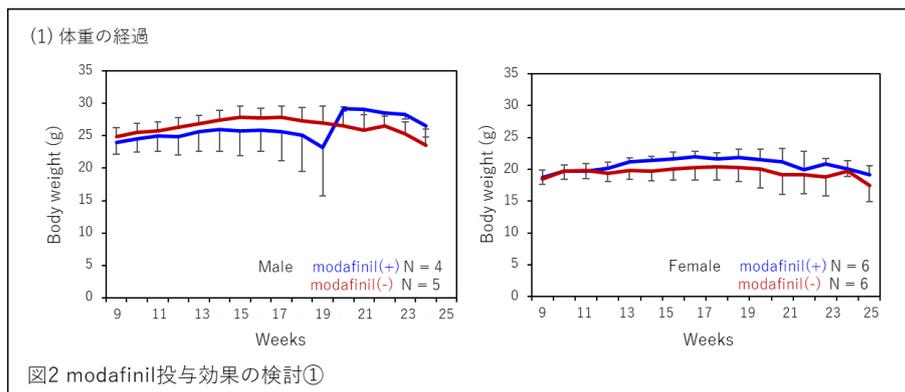
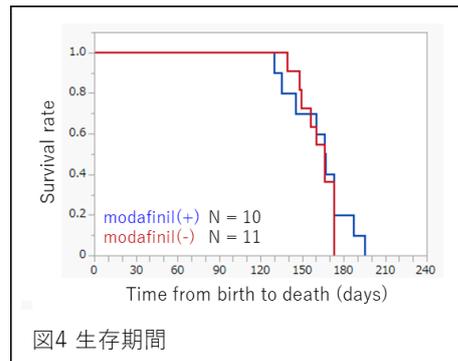
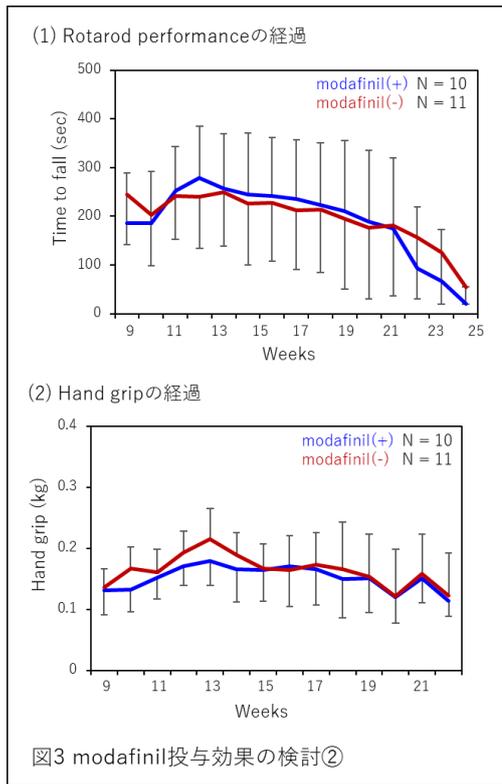


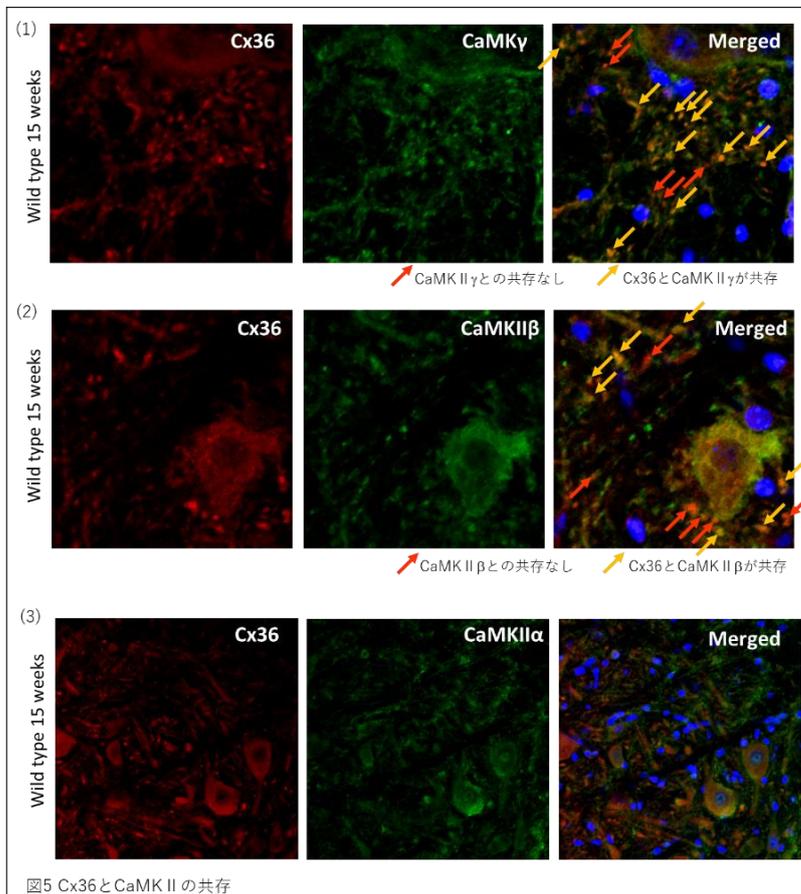
図2 modafinil投与効果の検討①



## (2) CaMK II による Cx36 の制御

野生型マウスの脊髄において、運動ニューロンに発現する Cx36 は、CaMK II サブタイプのうち CaMK II  $\gamma$  との共存を最も多く認め、次いで CaMK II  $\beta$  との共存を多く認めた (図 5-(1), (2))。一方 CaMK II  $\alpha$  との共存は認めなかった (図 5-(3))。12 週齢の SOD1<sup>G93A</sup> マウスの脊髄運動ニューロンでは、同週齢の野生型マウスに比べ、CaMK II  $\beta$  の発現が上昇していた (図 6)。

脊髄運動ニューロンでは、CaMK II  $\gamma$  及び  $\beta$  が Cx36 の可塑性を調整しており、Cx36 が形成する電気シナプスを回復するための標的候補となる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 小早川優子	4. 巻 90
2. 論文標題 抗GAD抗体が関連する神経症候群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経内科	6. 最初と最後の頁 397-401
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 Shiraishi W, Yamasaki R, Ko S, Kobayakawa Y, Matsushita T, Isobe N, Kira J	4. 巻 11
2. 論文標題 Clearance of peripheral nerve misfolded mutant protein by infiltrated macrophages correlates with motor neuron disease progression.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific report	6. 最初と最後の頁 16438
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96064-6	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 小早川優子	4. 巻 27
2. 論文標題 筋萎縮性側索硬化症の予後を反映した新規分類法の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 難病と在宅ケア	6. 最初と最後の頁 9-11
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小早川優子、眞崎勝久、山崎亮、白石渉、林信太郎、岡本幸市、吉良潤一
2. 発表標題 Downregulation of Cx36-made electrical synapses without glutamatergic axon terminals in ALS.
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 白石渉、山崎亮、小早川優子、吉良潤一
2. 発表標題 CCR2-positive peripheral blood macrophages play protective roles in ALS mouse model.
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 白石渉、山崎亮、橋本侑、小早川優子、吉良潤一
2. 発表標題 CCR2-positive macrophages infiltrated into the peripheral nerves protect motor neuron disease
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本侑、江千里、小早川優子、山崎亮、磯部紀子
2. 発表標題 The role of dysregulated connexin 30 expression in amyotrophic lateral sclerosis model mice
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------