

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16572

研究課題名（和文）ALSにおける活性化アストロサイトの極性転換に着目した新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Therapeutic Approach Focusing on Polarity Conversion of Reactive Astrocytes in ALS

研究代表者

四條 友望（Shijo, Tomomi）

東北大学・大学病院・医員

研究者番号：50836898

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）ではグリア細胞による非細胞自律的な神経障害が生じることが知られる。活性化アストロサイトは細胞障害性と細胞保護性の側面を持つ。本研究では活性化アストロサイトの極性転換に着目したALSにおける新規治療法の開発を目指すため、まず動物モデルにおけるアストロサイトの活性化パターンを解析した。アストロサイトは発症早期のALSラットにおいて細胞障害性マーカー優位に発現が亢進しており、介入時期の検討に有用であった。またラットを前肢発症群と後肢発症群に分け、各々の頸髄および腰髄を用いてRNAシーケンスを実施し、発症や病態の進展に関与する可能性のある新規遺伝子Fmodを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの発症早期において細胞障害性のアストロサイトが優位に活性化していることが明らかとなり、アストロサイトの極性転換を狙った新規治療法を実施する時期の検討に有用と考えられる。さらに発症部位特異的に発現が亢進していた遺伝子FmodはALSの発症や病態進展に関与している可能性があると考えられ、今後の解析が重要である。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) is known to cause non-cell-autonomous neuropathy by glial cells such as astrocytes and microglia. Reactive astrocytes have either cytotoxic (A1) or protective (A2) aspects. In this study, we first analyzed the reactive pattern of astrocytes in ALS animal models in order to develop a novel treatment for ALS focusing on the polarity shift of reactive astrocytes. Cytotoxic A1 marker expression was predominantly increased in early-onset ALS animal models, which was useful to consider the timing of intervention. Furthermore, we divided rats into forelimb- and hindlimb-onset groups and performed RNA sequencing in the cervical and lumbar spinal cords to identify a novel gene, Fmod, that may be involved in the pathogenesis and development of the disease.

研究分野：neurology

キーワード：ALS SOD1 astrocyte fibromodulin

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) をはじめとする神経変性疾患では、未だ変性した神経細胞を再生する治療は開発されていない。神経変性疾患では神経細胞の自律的な細胞死に着目した研究が多く進められていたが、近年、活性化したアストロサイトやミクログリアなどが神経細胞を傷害する、「非」細胞自律性の神経変性が認められ、病態進行を引き起こすことが明らかとなりつつある。

### 2. 研究の目的

本研究では活性化アストロサイトの不均一性に焦点をあて、ALS における活性化アストロサイトのプロファイル解明をめざすとともに、活性化アストロサイトの極性決定因子をトランスクリプトーム解析によって網羅的に明らかとする。新規に抽出された因子に対して介入実験を行い、活性化アストロサイトを細胞傷害性から細胞保護性へと変化させることで極性転換を実現する。上記結果を踏まえ、非神経細胞であるアストロサイトを治療標的に据えた新規の ALS 進行抑制療法開発へと発展させる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ALS ラットを用いたアストロサイト活性化パターンの経時的解析

当施設で確立した ALS 関連変異ヒト Cu/Zn スーパーオキシド・ジスムターゼ (superoxide dismutase, *SOD1*) 遺伝子過剰発現ラット (以下 ALS ラット) を用いる。まず生体内における活性化アストロサイトのプロファイルを解析するために、ALS ラットを未発症・発症早期・発症後期の 3 群に分け、週齢一致同腹仔 (以下 野性型) を対照とする。腰髄より RNA を抽出し、既知の活性化アストロサイトのマーカー発現を比較検証する。既知の細胞障害性アストロサイトのマーカーとして、*C3*、*Mx1*、*Cfb* を用い、既知の細胞保護性アストロサイトのマーカーとして、*S100a10* を用いる (Liddlelow SA *et al.*, Nature 2017)。また上述の ALS ラットおよび野性型における腰髄の新鮮凍結切片を用いた蛍光免疫組織染色を行い、タンパク質レベルでの発現を確認する。

#### (2) ALS ラットを用いた発症に関与する分子の網羅的解析

ALS ラットは概ね週齢 24~25 週で片側前肢もしくは後肢の運動麻痺を呈することで発症する。このラットの発症観察を仔細に行い、発症当日の ALS ラットより頸髄と腰髄を採取する。ラットを前肢発症群と後肢発症群に分け、発症部位特異的に発現が変動している因子を RNA シークエンスで網羅的に解析し抽出する。

### 4. 研究成果

#### (1) ALS ラットを用いたアストロサイト活性化パターンの経時的解析

各群 4 匹、計 6 群での解析を行った。まず qRT-PCR を行ったところ、ALS ラット腰髄では野性型に比して、発症早期で細胞障害性アストロサイトのマーカーが両者とも有意に増加していた (図 1)。蛍光免疫組織染色では、それらのタンパクがアストロサイトに発現していることを確認した。以上より、アストロサイトが活性化するのは主に発症早期であること、かつ、細胞障害性アストロサイト優位に活性化が生じることが明らかとなった。

#### (2) ALS ラットを用いた発症に関与する分子の網羅的解析

まず網羅的解析として、前肢発症および後肢発症の ALS ラット各 3 匹、および野性型 3 匹を用いて RNA を抽出した。ヒト *SOD1* および内因性のラット *SOD1* の発現量は、前肢発症群と後肢発症群間で有意差を認めなかった。RNA 溶液の質を確認した後に RNA シークエンスを実施したところ、ALS ラットにおいて発症部位特異的に発現が亢進している遺伝子 *Fibromodulin (Fmod)* が同定された。その後より多数の ALS ラット (雄、前肢発症群 9 匹、後肢発症群 18 匹; 雌、前肢発症群 10 匹、後肢発症群 7 匹) を用いて同様に頸髄と腰髄による遺伝子 X の発現量を検証したところ、RNA シークエンスの結果と同様、発症部位特異的に *Fmod* の発現が亢進することを確認した (図 2)。*Fmod* は細胞外マトリックスを構成するタンパクの一つであり、細胞リプログラミングや血管新生、膠原線維の新生などに携わることが知られている (Jan AT *et al.*,

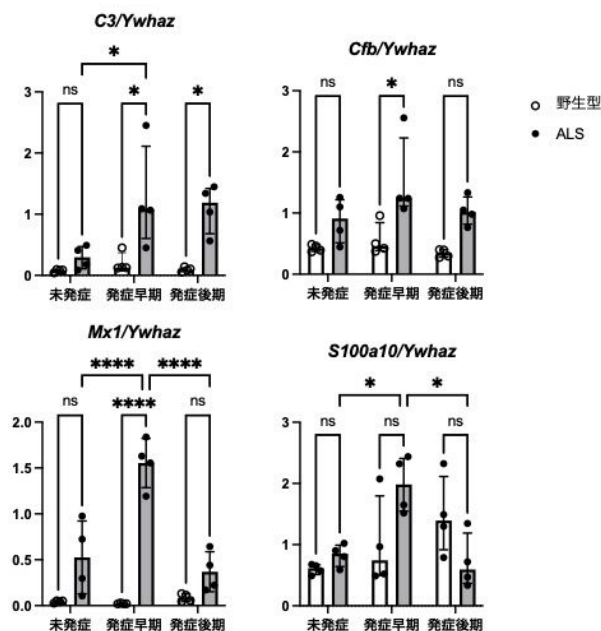


図 1. アストロサイトのマーカー

Int J Biochem Cell Biol 2016)。Fmodが発症極早期のALSラットにおいて発症部位特異的に発現亢進していたということは、ALSの発症や神経編成の進展にFmodが強く関与している可能性があることを示す。

(3) その他

当教室は臨床系の教室であり、日常診療を行っている。特に宮城県におけるALS患者の診療を中心的に担っており、年間大凡30例~40例の新規診断例を有する。当教室

で診断を行ったALS患者の後方視的解析を実施し、ALS患者の発症部位における予後予測について報告した (Shijo T *et al.*, Neurol Clin Neurosci 2022)。さらに東北大学病院耳鼻咽喉科と連携し、ALS患者の診断時における嚥下機能が胃瘻造設までの期間と相関することを示し、報告した (Shijo T *et al.*, Tohoku J Exp Med 2023)。

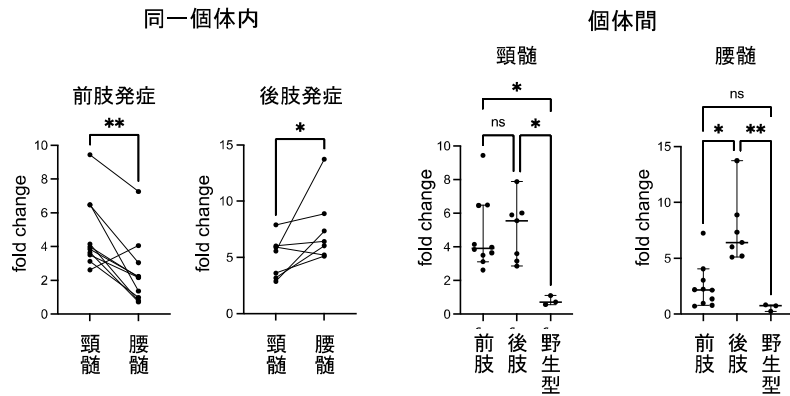


図 2. Fmod の発現量

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 Tomomi Shijo, Ryoukichi Ikeda, Naoki Suzuki, Jun Ohta, Jun Suzuki, Ai Hirano-Kawamoto, Kengo Kato, Kensuke Ikeda, Rumiko Izumi, Shio Mitsuzawa, Hitoshi Warita, Masaaki Kato, Masashi Aoki, Yukio Katori	4. 巻 259
2. 論文標題 Videofluoroscopic Dysphagia Scale as an Additional Indicator of Gastrostomy in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis with Dysphagia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med	6. 最初と最後の頁 293-300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.2023.J005.	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 Shijo Tomomi, Suzuki Naoki, Warita Hitoshi, Kawauchi Yuko, Mitsuzawa Shio, Ikeda Kensuke, Izumi Rumiko, Ono Risako, Ohno Akiyuki, Toyoshima Masaya, Harada Ryuhei, Kuroda Hiroshi, Kato Masaaki, Aoki Masashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Patients with lower limb onset ALS who have a longer duration from onset to diagnosis have a better prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 239 ~ 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ncn3.12652	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 0件）

1. 発表者名 Tomomi Shijo
2. 発表標題 Videofluoroscopic dysphagia scale estimates the gastrostomy timing in amyotrophic lateral sclerosis.
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
---------	---------