

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790834
 研究課題名（和文）
 筋萎縮性側索硬化症におけるマクログリアの貪食機能評価と抗原処理機構の解明
 研究課題名（英文）
 Evaluation of phagocytic function and analysis of antigen-processing mechanism of microglia in ALS
 研究代表者 山下 博史(Yamashita Hirofumi)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：60402913

研究成果の概要（和文）：

最初に、ALS モデルマウスの脊髄病巣におけるマクログリアの挙動を免疫染色にて評価した。SOD1^{G85R} トランスジェニックマウス発症期の脊髄の免疫染色から、マクログリアが SOD1 凝集体を細胞内に取り込んでいる、もしくは取り囲んでいる像を得た。このことから、マクログリアが完全に SOD1 凝集体を消化しきれていない、frustrated phagocytosis の状態を反映している可能性が考えられた。次に、凝集体の貪食細胞内への取り込みを評価する目的で、Flow Cytometry により貪食細胞内の蛍光ビーズを定量する測定系を確立した。その系を用いて直径 1 μm ポリスチレンビーズの細胞内取り込み能力を、初代培養により調整した、SOD1^{G85R} 発現マクログリアと野生型マクログリアで比較したが、特に違いを認めなかった。SOD1^{WT} fibril 又は SOD1^{G85R} fibril を培地に添加すると、一部は培地中で凝集した後マクログリア内に取り込まれることを確認した。そこで、SOD1^{G85R} をビーズに吸着させて、変異 SOD1 凝集体擬似体を作成し、SOD1^{G85R} 発現マクログリアと野生型マクログリアへの取り込み能を測定したが、明らかな有意差を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

First, we evaluated by immunohistochemistry the microglial behavior in spinal cord lesion of ALS mouse model. We found that microglia uptaked, or surrounded the SOD1 aggregates in the spinal cord of the SOD1^{G85R} transgenic mouse at symptomatic stage. Therefore we hypothesized that these microglia reflected the state of “frustrated phagocytosis” when microglia could not digest SOD1 aggregates fully. Next, in order to quantify the uptake of aggregates into microglia, we established the system to measure the fluorescent beads incorporated into the phagocytes. Using the system, we compared the SOD1^{G85R} expressing-microglia with wild-type ones, but no difference was found. We confirmed the aggregates of the SOD1^{WT or G85R} fibrils were incorporated into microglia when they were added into medium. Then we made the mutant SOD1 aggregate-mimics by adsorb SOD1^{G85R} into beads and examined the ability of wild-type or SOD1^{G85R} -expressing microglia to incorporate them, but no difference was found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

1. 研究開始当初の背景

ALS は成人発症の神経変性疾患であり、選択的な運動ニューロン死を原因とした呼吸筋を含む骨格筋の進行性筋力低下・麻痺により、患者が人工呼吸器装着を希望しない場合は2-5年で死亡する神経難病である。ALSの約10%は遺伝性であり、その中で最も多いものは1993年に遺伝性ALS家系において報告されたスーパーオキシドディスムターゼ(SOD1)の変異によるものであるが、その変異SOD1遺伝子のトランスジェニックマウスは、実際の患者と同じく運動ニューロン死による筋力低下を認めるため、現時点で唯一のALSマウスモデルとなっている。変異SOD1トランスジェニックマウスではユビキタスに変異SOD1が発現しているが、Cre/LoxPシステムを用いたコンディショナルノックアウト、又は骨髄移植の手法を用いてマイクログリアから変異SOD1を選択的に除去することによりマウスモデルの延命効果が得られることが報告された。このことは、運動ニューロン死に至るALSの疾患の進行には、細胞死を認める運動ニューロン以外のマイクログリアの直接の関与を示しているが、その非自律的神経細胞死のメカニズムを解明することは重要なテーマとなっている。

我々はまず最初にALSマウスモデルであるSOD1^{G85R}トランスジェニックマウスの疾患進行期の脊髄前角の病理像からマイクログリアがALSの病態にどのように関与しているかを考察することにした。脊髄前角を抗SOD1抗体で染色すると運動ニューロン内に加えて細胞外にSOD1凝集体を認めるが、マイクログリアマーカーであるIba1で共染色すると、細胞外SOD1凝集体をマイクログリア内に取り込んでいる、もしくはマイクログリアで取り囲んでいる像を得た。このことは、マイクログリアが細胞外SOD1凝集体を食食作用により処理している、もしくは処理しようとしていることを示唆する。神経変性疾患において、マイクログリアが集積する細胞外凝集体としてはAlzheimer病の特徴である老人斑が有名であるが、変異SOD1によるALSにおいても神経細胞から変異SOD1が分泌されることが示されており、さらに細胞内変異SOD1凝集体を持つ運動ニューロンの細胞死と共に細胞外へ放出されることになるため、細胞外SOD1凝集体がマイクログリアに作用・影響し、その結果運動ニューロン死を促進させる可能性がある。

マイクログリアの機能としては、(1)異物の食食作用、(2)各種サイトカインや栄養因子の分泌、(3)抗原提示機能が、主に挙げられる。特に死細胞や外来抗原を含む異物の食

食作用は、マイクログリアにおける最も基本的な機能であるが、Alzheimer病患者のマクロファージにおいて、老人斑の構成タンパク質の一つのA β (アミロイドベータ)の食食機能が低下していることが示されている。これまでにALSにおけるマイクログリアの食食能に焦点を当てた研究は少なく、マイクログリアの食食能が低下しているか否かは不明だが、マイクログリアが疾患進行に関わる機序の一つとして、マイクログリアに存在するNADPH oxidaseから放出されるスーパーオキシドが疾患の進行要因であることが示されている。我々は、「ALSにおいて、マイクログリアの食食能の低下から frustrated phagocytosis と呼ばれる、サイトカインやフリーラジカルが過剰に分泌される状態を引き起こし、運動ニューロン障害を促進する」という仮説を立てて研究を進めることとした。マイクログリアにおいて食食能が低下する根拠の一つとして、SOD1凝集体を食食すべきマイクログリア自体にもSOD1が発現しているため、マイクログリアがSOD1凝集体を細菌のように明確な外来抗原としては認識もしくは処理出来なくなっている可能性がある、ということが挙げられる。さらにマイクログリアの内在性変異SOD1と、食食により細胞内に取り込まれた外来性変異SOD1の分解・処理能力が共通経路において飽和している可能性も考えられる。

また、マイクログリアを含む抗原提示細胞が外来抗原と自己抗原に同時にさらされた場合に、それらをどのようにして区別して外来抗原のみを抗原提示経路に回すかは重要なテーマであるが、その過程でToll-like receptorの関与が報告されている。変異SOD1が中枢神経系の抗原提示細胞であるマイクログリアに自己抗原または外来抗原のどちらとして認識されて処理を受けるかは、ALSにおけるマイクログリアでの細胞内シグナル伝達に関係するため、ALSにおけるマイクログリア毒性を追求する上で重要と考える。

2. 研究の目的

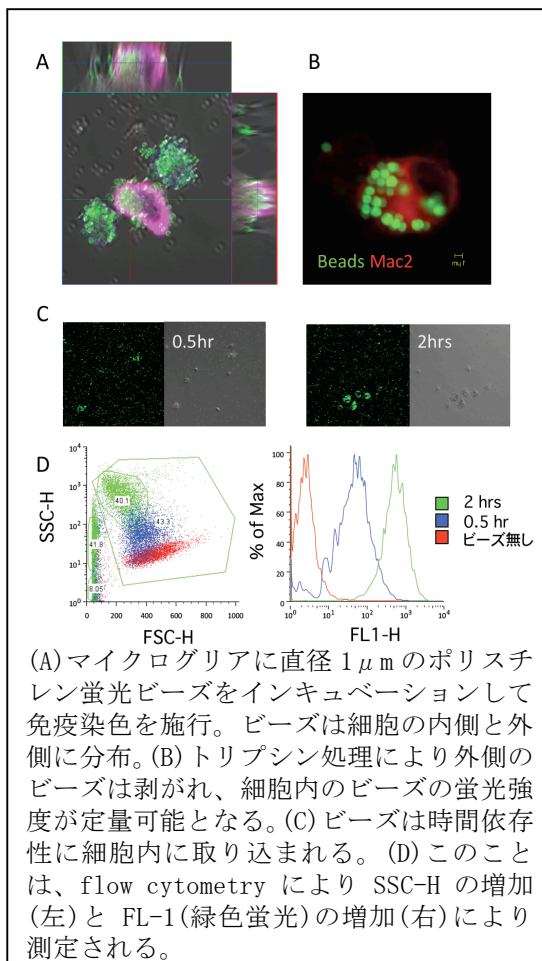
ALSマウスモデルの脊髄病巣の免疫染色結果より、「マイクログリアの食食能の低下から frustrated phagocytosis の状態を引き起こし、マイクログリアから過剰な細胞障害性サイトカイン類が分泌され、運動ニューロン死を促進する」という仮説に基づき、ALSモデルマウス由来初代培養マイクログリアの変異SOD1凝集体に対する食食能や抗原認識の様式、抗原処理過程を検討し、ALSにおいてマイクログリアの食食機能を調節することによる治療を目標とする。

3. 研究の方法

ALS モデルマウス脊髄のマイクログリアの状態を、組織免疫染色にて観察する。蛍光ビーズを用いた Flow Cytometry によるマイクログリアの貪食能の測定系を確立する。その系を用いて、変異 SOD1 を発現しているマイクログリアの貪食能を評価する。貪食される基質としては、ポリスチレンビーズと、変異 SOD1 凝集体に対する貪食能を測定するため、蛍光ビーズに精製変異 SOD1 を吸着させたものを調製し貪食させる。

4. 研究成果

最初に、SOD1 マウスの脊髄病巣におけるマイクログリアの挙動を免疫染色にて評価した。SOD1^{G85R} トランスジェニックマウス発症期の脊髄の免疫染色から、マイクログリアが SOD1 凝集体を細胞内に取り込んでいる、もしくは取り囲んでいる像を得た。このことは、マイクログリアが完全に SOD1 凝集体を消化しきれていない、frustrated phagocytosis の状態を反映している可能性が考えられた。



In vitro の実験系の構築を目的として、まずマイクログリアに取り込まれた蛍光ビーズ又は EGFP を発現する蛍光大腸菌の細胞内

局在を調べた。どちらもリソソームのマーカーである LysoTracker と共局在することを示し、蛍光ビーズや大腸菌が本来の貪食後の分解系で処理されようとしていることを確認した。

次に、蛍光ビーズを用いた Flow Cytometry によるマイクログリアの貪食能の測定系を確立した(図参照)。その測定系から、初代培養マイクログリア>HEK293T>初代培養アストロサイト=NSC34の順に 1 μm の大きさのビーズの貪食作用が強いことが判明した。

変異 SOD1 を内因性に発現している場合のマイクログリアの貪食能を調べるために、初代培養により変異 SOD1 発現マイクログリアと野生型マイクログリアを調整し、直径 1 μm のポリスチレンビーズと大腸菌の細胞内への取り込み能力を測定したが、有意差を認めなかった。

SOD1^{WT} 又は SOD1^{G85R} fibril を培地に添加すると、一部は培地中で凝集した後にマイクログリア内に取り込まれることを確認した。次に SOD1^{G85R} をビーズに吸着させて、変異 SOD1 凝集体擬似体を作成し、SOD1^{G85R} 発現マイクログリアと野生型マイクログリアへの取り込み能力を測定したが、明らかな有意差を認めなかった。

本研究による in vitro の実験系では、マイクログリアにおける内因性的変異 SOD1 の発現の違いによって、凝集体の細胞内取り込み能力に明らかな差を認めなかった。今後の研究の方向としては、凝集体の細胞内取り込み後の処理能力(リソソームとの融合やファゴリソソーム内での分解能力、抗原提示形式の違い等)を評価することにより、変異 SOD1 を発現するマイクログリアの機能異常が明らかとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

山下博史、山中宏二
ALS 病態におけるグリアの役割
脳 21
査読無し
2012 年 15 巻 p28-33
DOI:該当無し

山下博史、山中宏二
ALS-SOD1 の発症機序
Clinical Neuroscience
査読無し
2011 年 29 巻 p1044-1045
DOI:該当無し

〔学会発表〕（計 2 件）

第 52 回日本神経学会学術大会

名古屋国際会議場

2011 年 5 月 18 日

山下博史、藤森典子、片岡礼音、井口洋平、
熱田直樹、田中章景、祖父江元、山中宏二

「細胞特異的トランスクリプトームを用いた、
弧発性 ALS 患者脊髄の DNA マイクロアレイによる解析」

第 51 回日本神経学会学術大会

東京国際フォーラム

2010 年 5 月 22 日

山下博史、藤森典子、片岡礼音、山中宏二

「変異 SOD1 発現マイクログリアにおける食
食機能の評価」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 博史 (Yamashita Hirofumi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60402913