

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790883

研究課題名(和文)新規神経栄養因子BAFFによるALS治療の試み

研究課題名(英文)Therapeutic potential against amyotrophic lateral sclerosis with BAFF which is a novel neurotrophic factor

研究代表者

多田 智(Tada, Satoru)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70626530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞刺激因子(BAFF)は、BAFFレセプター(BAFFR)を受容体として作用するB細胞分化/生存に必須のサイトカインであるが、神経細胞にもBAFFRの発現が認められた。BAFFR欠損マウスから作成した培養神経細胞は低栄養条件下での生存率がコントロールと比較して低く、筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスであるmSOD1マウスとBAFFRKOマウスを交配させて作成したmSOD1/BAFFRKOマウスはコントロール群と比較して神経変性が増悪していた。神経系におけるBAFFRシグナルは神経保護に働いている可能性があり、BAFFが新たな神経栄養因子としての神経疾患治療に利用可能である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various neuroprotective factors have been shown to help prevention of neuronal cell death, which is responsible for the progression of neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Here we show the role of BAFF-R signaling pathway in the control of neural cell survival. Both B cell activating factor (BAFF) and its receptor (BAFF-R) are expressed in mouse neurons and BAFF-R deficiency reduces the survival of primary cultured neurons. Impaired BAFF-R signaling resulted in accelerated disease progression in an animal model of inherited ALS. We further demonstrate that BAFF-R deficient bone marrow cells or genetic depletion of B cells does not affect the disease progression, indicating that BAFF-mediated signals on neurons, not on B cells, support neural cell survival. These findings suggest opportunities to improve therapeutic outcome for patients with neurodegenerative diseases by synthesized BAFF treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経変性 免疫反応 B細胞 BAFF 筋萎縮性側索硬化症(ALS)

1. 研究開始当初の背景

B細胞刺激因子(BAFF)は、BAFF レセプター(BAFFR)を受容体として作用するサイトカインである。BAFFはB細胞の分化と生存に必須であることが知られているが、神経系におけるその作用は不明である。BAFFRは神経成長因子レセプター(Nerve growth factor receptor: NGFR)と同じく Tumor necrosis factor receptor superfamilyに属しており、BAFFはNGFと同様に神経栄養作用を持つ可能性がある。

2. 研究の目的

神経系におけるBAFF及びBAFFRの役割を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)細胞培養：マウス胎児神経細胞初代培養は胎生13.5日齢のマウス胎児大脳から調整し、2%B27サプリメントを加えたニューロベイスル培地で培養した。マウス胎児アストロサイト初代培養は、上述と同時期のマウス胎児を用いて、PLLでコートしたシャーレ上で神経グリア混合培養を作成し、翌日にシャーレを振盪してアストロサイトのみを剥離し、再度培養した。ニューロンの培養細胞としてマウス神経芽細胞腫由来であるNeuro2a細胞を使用し、ミクログリアの培養細胞として6-3ミクログリア細胞を使用した。

(2)免疫細胞染色：初代神経培養細胞とNeuro2a細胞をPFAで固定し、抗BAFF抗体、抗BAFFR抗体、抗Map2抗体で染色した。

(3)免疫組織染色：C57BL6/JマウスをPFAで灌流固定し、脊髄を採取してPFAで追加固定を行い、10μmの厚さの切片を作成し、ブロッキングを行った後、抗BAFF抗体、抗BAFFR抗体、抗SMI32抗体、抗GFAP抗体で染色した。

(4)レクチン染色：上述のマウス脊髄切片をレクチンで染色し、ミクログリアの局在、形態、抗BAFF抗体ならびに抗BAFFR抗体との共染色性を評価した。

(5)ウェスタンブロッティング：培養神経細胞をNP40バッファーで溶解し、SDSポリアクリルアミドゲルで蛋白を分離してニトロセルロース膜に転写し、抗Akt抗体、抗リン酸化Akt抗体、抗βactin抗体と反応させた。

(6)神経細胞生存評価：培養神経細胞のうち、免疫染色にてMap2陽性となるものを生存神経細胞と定義して定量した。

(7)交配実験：ALSのモデル動物として、ヒト変異SOD1遺伝子トランスジェニックマウス(mSOD1マウス)を利用した。また、BAFFシグナルの神経変性に対する影響を評価する目的で、BAFFレセプター欠損マウス(BAFFR KOマウス)を利用した。さらに、B細胞が直接神経変性に与える影響を評価するために、IgM欠損マウス(IgMKOマウス)を使用した。全ての実験動物は、大阪大学実験動物倫理規定に則り扱った。上記マウスを交配して、

mSOD1/BAFFRKOマウス並びにmSOD1/IgMKOマウスを作成した。

(8)モデル動物運動症状評価：モデル動物の神経変性を臨床的に評価するために、週に2回の体重測定とhanging wire test(運動機能評価試験)を行った。

(9)坐骨神経有髄神経数計測：75日齢のmSOD1/BAFFRKOマウス及びmSOD1/BAFFR野生型マウスの坐骨神経を採取し、エポキシに包埋して切片を作成し有髄神経数を評価した。

(10)骨髄移植：9~12週齢のBAFFR野生型マウスまたはBAFFRKOマウスから骨髄細胞を採取し、40日齢のmSOD1/BAFFRKOマウスに投与した。投与の前に、レシピエントマウスには600radの放射線照射を行い、1.5×10⁷個の骨髄細胞を投与した。

4. 研究成果

(1)BAFF及びBAFFRは神経細胞に発現している。

神経細胞におけるBAFFとBAFFレセプターの発現を確認するために、免疫細胞染色と免疫組織染色を行った。マウス胎児から樹立した初代神経培養細胞、neuro2a細胞、マウス脊髄における神経細胞にBAFF及びBAFFRの発現が認められた。(図1、2)

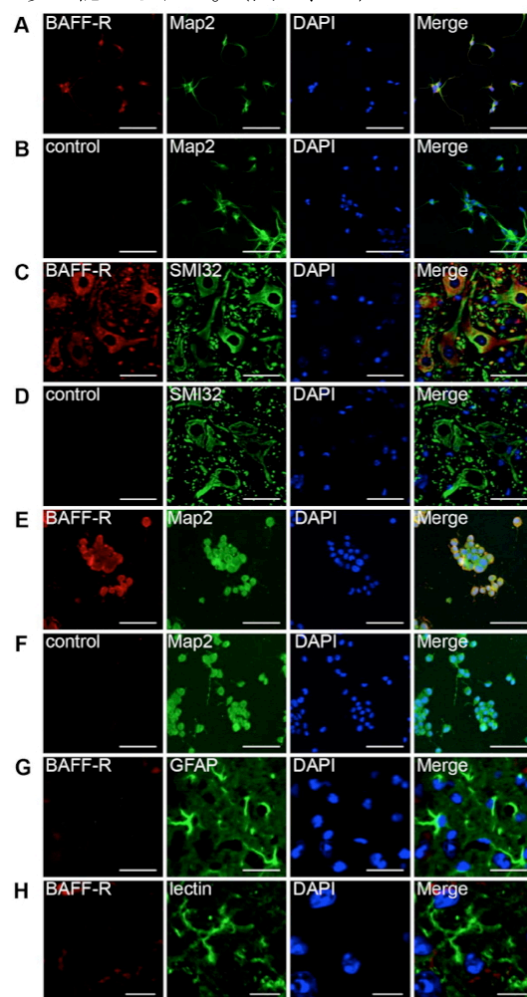


図1 神経細胞及びその他の中枢神経細胞におけるBAFFRの発現

(A, B) 初代培養神経細胞における BAFFR の発現 (C, D) C57BL6/J マウス脊髄での BAFFR の発現 (E, F) neuro2a 細胞における BAFFR の発現 (G, H) C57BL6/J マウス脊髄のアストロサイトにおける BAFFR の発現 (G) とミクログリアにおける BAFFR の発現 (H)

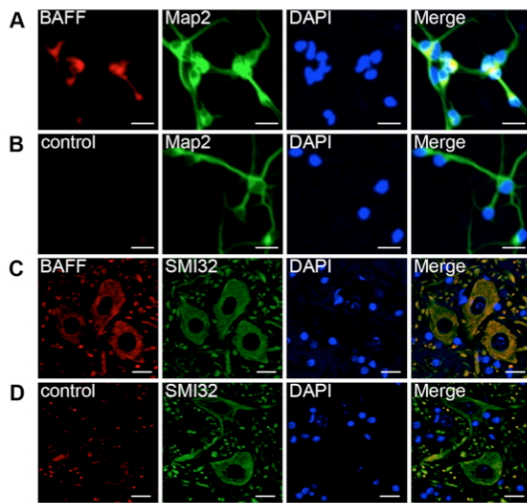


図2 神経細胞における BAFFR の発現 (A, B) 初代培養神経細胞における BAFFR の発現 (C, D) C57BL6/J マウス脊髄での BAFFR の発現

(2) BAFFR シグナルは神経生存のために重要である

BAFFR 野生型マウスと BAFFRKO マウスから樹立した初代神経培養細胞を低栄養下で培養すると、BAFFR 野生型マウスの神経細胞の生存率が BAFFRKO マウスと比べて高いという結果が得られた。両細胞内の Akt のリン酸化をウェスタンブロッティングにて比較したところ、BAFFRKO マウスから樹立した培養神経細胞ではリン酸化 Akt の発現の低下を認め、これが BAFFRKO マウス神経細胞の低生存率の一因であると考えられた。

(3) BAFFR シグナルの欠損は ALS マウスの神経変性を加速させる

BAFFR シグナルによる神経生存促進効果を体内で確認するために、mSOD1 マウスと BAFFRKO マウスを交配させ mSOD1/BAFFRKO マウスを作成し、mSOD1/BAFFRWT マウスをコントロールマウスとして症状を比較した。mSOD1/BAFFRKO マウスはコントロールマウスと比較して疾患後期において体重減少が著しく、また運動機能も観察していた全期間で有意に悪化していた。生存率は mSOD1/BAFFRKO マウスで有意に短縮しており、坐骨神経内の有髄神経線維数は mSOD1/BAFFRKO マウスで有意に低下していた (図3)。

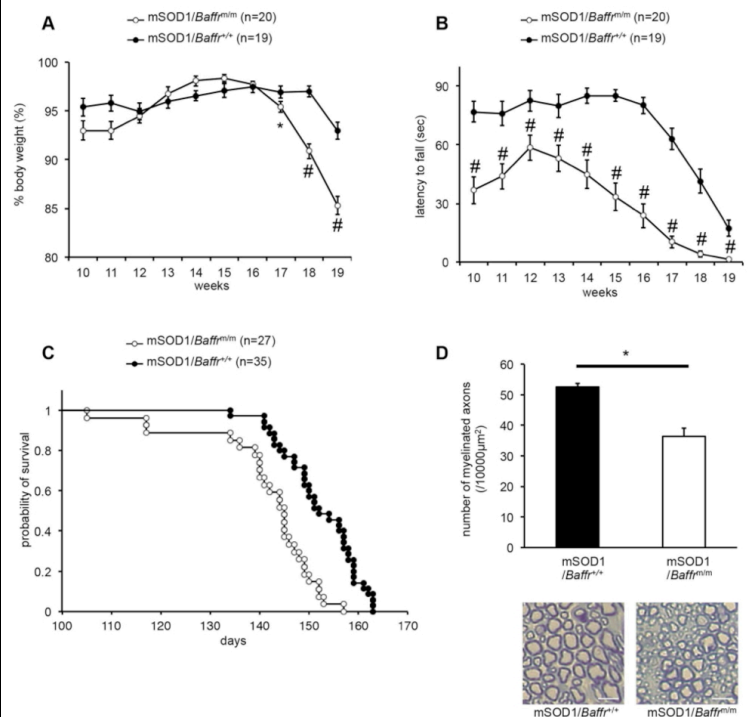


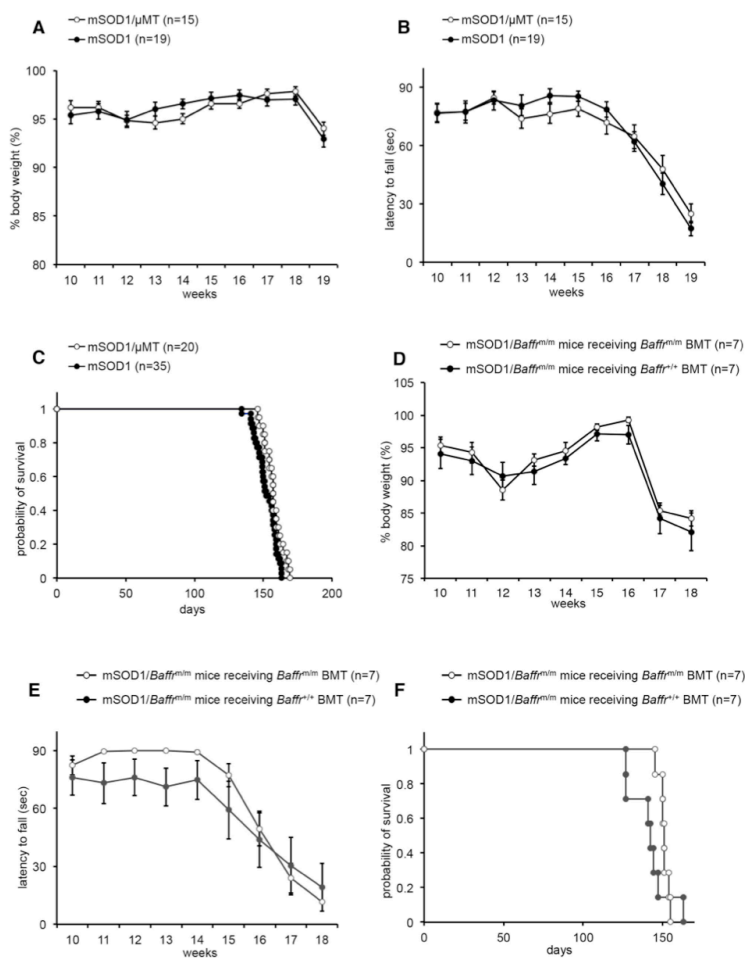
図3 mSOD1/BAFFRKO マウスは運動神経変性が悪化する

(A, B) mSOD1/BAFFRKO マウスはコントロールマウスと比べて疾患後期の体重が有意に低下し、全病期を通じて運動機能が低下している (C) mSOD1/BAFFRKO マウスはコントロールマウスと比べて生存期間が有意に短縮する (D) mSOD1/BAFFRKO マウスの坐骨神経ではコントロールマウスとくらべて有髄神経数が有意に減少している

(4) BAFFR シグナルの欠損による神経変性増悪は、B 細胞や骨髄細胞による効果ではなく、神経細胞に発現している BAFFR による直接的な効果である

mSOD1/BAFFRKO マウスで認められた神経変性の増悪が、B 細胞の不在や、骨髄細胞の性質変化に起因するものかどうか評価するために、B 細胞の存在しない IgMKO マウス (μMT マウス) と mSOD1 マウスを交配させ mSOD1/IgMKO マウスを作成し、コントロールとしての mSOD1/IgMWT マウスと症状を比較した。この結果、mSOD1/IgMKO マウスとコントロールマウスの間には、運動機能、体重減少、生存期間について有意な差は認められなかった (図4)。更に、骨髄細胞に発現している BAFFR シグナルが神経変性に与える影響を評価するために、骨髄移植により骨髄キメラマウスを作成した。骨髄細胞に BAFFR が発現している ALS マウス群 (mSOD1/BAFFRKO receiving BAFFRWT BMT) と骨髄細胞に BAFFR が発現していない ALS マウス群 (mSOD1/BAFFRKO receiving BAFFRKO BMT) の運動症状を比較したが、両群の運動機能、体重、寿命に有意な差は認められなかった。この結果から、mSOD1/BAFFRKO マウスで認められた神経変性増悪症状は、B 細胞の不在や骨

髓細胞における BAFFR シグナルの欠損によるものではなく、神経細胞に発現している BAFFR からのシグナル伝達が起こらないことに起因していることが示唆された (図 4)。



(図 4) mSOD1/IgM KO マウスとコントロールマウスでは神経変性に有意な差を認めない。骨髄細胞にのみ BAFFR を発現している mSOD1/BAFFR KO マウスと、骨髄を含め全細胞の BAFFR シグナルが遮断されている mSOD1/BAFFR KO マウスの間では神経変性の程度に有意な差が見られない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H. BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor. PLoS One. 2013 29;8(7):e70924. 査読有

② Yasui T, Sakakibara-Yada K, Nishimura T, Morita K, Tada S, Mosialos G, Kieff E, Kikutani H. Protein kinase N1, a cell inhibitor of Akt kinase, has a central role in quality control of germinal center formation. Proc Natl Acad Sci USA. 2012 18;109(51):21022-7. 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 第 53 回日本神経学会学術集会、演題名「新

規神経栄養因子としての B 細胞刺激因子 (BAFF)」、多田 智、東京、2012 年 5 月 22 日
 ② 第 21 回世界神経学会学術集会、演題名「BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor」、多田 智、ウィーン、2013 年 9 月 25 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 0 件)

○ 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 智 (TADA Satoru)

大阪大学医学部附属病院医員

研究者番号：70626530