

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293208

研究課題名(和文) アストロサイト異常に着目した遺伝性・孤発性ALSの病態解明

研究課題名(英文) Elucidating pathomechanism of ALS through the abnormality in astrocytes

研究代表者

山中 宏二 (YAMANAKA, Koji)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：80446533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)のモデルマウスを用いて、グリア細胞の一種であるアストロサイトの異常に着目して研究を行った。ALS患者・マウスのアストロサイトでは、サイトカインTGF- β 1が異常に増加し、グリア細胞による神経保護環境を阻害することにより、病態を加速していることが判明した。TGF- β 1の阻害剤投与により、ALSマウスの生存期間が延長したことから、TGF- β 1はALSの治療標的として有望であると考えられた。また、ALSマウスの病巣では異常に活性化したアストロサイトが見られ、その除去機構として、自然免疫分子であるTRIFが関与するアポトーシスが関与していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Using model mice for amyotrophic lateral sclerosis (ALS), we identified cytokine TGF- β 1 as a detrimental factor for ALS by interfering a neuroprotective environment mediated by glial cells. TGF- β 1 was abnormally upregulated in astrocytes of human ALS and a mouse model for ALS. Administering TGF- β 1 inhibitor slowed disease progression in ALS mice, indicating TGF- β 1 as a potential therapeutic target for ALS. In addition, we elucidated a novel role of innate immune adaptor TRIF in eliminating abnormally activated astrocytes through inducing apoptosis.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経変性疾患 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患の病態研究において、神経細胞の病態に着眼した研究が主流であり、グリア細胞の病的変化は神経変性に随伴する二次的な現象であると考えられてきた。しかし、運動神経死を特徴とする神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症(ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis)に関する最近の研究を通じて、神経変性の過程で活性化し、細胞傷害性サイトカインなどの異常放出を惹起するグリア細胞は、神経疾患の病態に積極的に関与する細胞群として非常に注目されている。

SOD1(Cu/Zn superoxide dismutase)は優性遺伝性 ALS の原因遺伝子であり、その病因遺伝子産物である変異 SOD1 蛋白が本来の酵素活性と無関係の毒性を発揮すること(gain of toxic function)が運動神経死に深く関与すると考えられている。変異 SOD1-ALS モデルにおける重要な未解決問題として、代表者はこれまでに、変異 SOD1 が毒性を発現する細胞群の同定を行ってきた。代表者は ALS の疾患進行を加速するのは運動神経に起こる病的変化ではなく、グリア細胞であるミクログリアとアストロサイトに起こる病的変化であることを証明した(Science, 2006; Nat Neurosci, 2008)。また、アストロサイトに分化するグリア幹細胞の移植により変異 SOD1 ラットの生存期間が延長した報告(Lapore, Nat Neurosci, 2008)は、代表者らの研究結果とともにグリア細胞の正常化によって ALS の神経細胞死が遅延することを支持する。

一方、孤発性 ALS における TDP-43 タンパク質の異常蓄積の発見(Arai, BBRC, 2006; Neumann, Science, 2006)や、遺伝性、孤発性 ALS 患者において TDP-43 遺伝子変異が同定されたことから、孤発性 ALS における運動神経変性に TDP-43 の機能異常が深く関与すると考えられている。TDP-43 はおもに核に局在する RNA 結合タンパク質であり、遺伝子のスプライシング調節因子として知られているが、その詳細に関しては未解明な点が多い。多くの研究で TDP-43 変調の場は、運動神経と考えられているが、ごく最近の知見からは、TDP-43^{M337V} 変異 ALS 患者から樹立した iPS 細胞由来アストロサイトの細胞死(Serio, PNAS, 2013)や、孤発性 ALS 脊髄アストロサイト様細胞における機能変調(Haidet-Phillips, Nat Biotech, 2011)、TDP-43 変異をアストロサイトに発現するラットにおける神経変性(Tong, EMBO J, 2013)等が示され、アストロサイトの変調は SOD1-ALS のみでなく、TDP-43 の変調による孤発性・遺伝性 ALS に広く関与しうることが強く示唆される。

このように、SOD1-ALS モデルで見いだされたアストロサイト病態の関与と「非自律性」の神経変性機序は、TDP-43 異常による孤発性・遺伝性 ALS の病態メカニズムへ広がりを見せている。

2. 研究の目的

グリア細胞が関与する「非自律性」の神経変性機序は、神経変性疾患の新たな治療標的として注目されている。ALS における「非自律性」の神経変性の実行細胞として代表者らが同定したアストロサイトは、最近では TDP-43 の変調による ALS にも広く関与しうると考えられる。本研究では、アストロサイトの分子病態の解明と治療標的の同定を目指して、代表者が最近同定した TGF- β 経路を標的とした候補分子アプローチと病因遺伝子の発現をアストロサイト特異的に制御できる ALS マウスを用いた網羅的解析により遺伝性・孤発性 ALS の双方の病態に関わる鍵分子を同定し、アストロサイトを標的とした ALS の治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 候補遺伝子アプローチ：アストロサイトにおける TGF- β の抑制法を確立し、変異 SOD1 マウスを用いて TGF- β 阻害剤の投与実験を行い、病態、グリア活性化、神経栄養因子発現を指標にその効果を判定する。

(2) 活性化アストロサイトの病態への関与に関する研究：変異 SOD1 マウスにおける異常活性化アストロサイトについて、発現分子の解析や組織病理学的解析を通じてその意義を明らかにする。

(3) 遺伝子網羅的解析：アストロサイトから変異 SOD1 を除去したマウスとアストロサイトに変異 TDP-43 を発現したマウスの脊髄における異常発現分子を網羅的同定・比較検討する。

4. 研究成果

(1) アストロサイト由来 TGF- β は、ALS の進行を加速する病態増悪因子である：

変異 SOD1^{G93A} マウス脊髄で TGF- β 1 mRNA の発現が上昇し、アストロサイトにおける TGF- β タンパク質の発現が上昇することを見いだした。また、アストロサイト特異的に TGF- β 1 を過剰発現する ALS マウス(SOD1^{G93A}/TGF- β 1 マウス)を SOD1^{G93A} と GFAP-TGF- β 1 マウスの交配により作成した。SOD1^{G93A}/TGF- β 1 マウスは、SOD1^{G93A} マウスと比べて、その疾患進行が加速して平均寿命が短縮した。また、SOD1^{G93A} マウス脊髄における内在性 TGF- β 1 の遺伝子発現量は、生存期間と逆相関していることを見いだした。さらに、SOD1^{G93A}、SOD1^{G93A}/TGF- β 1 マウス由来のグリア混合初代培養細胞と末梢血単核細胞の共培養系を用いた実験で、SOD1^{G93A}/TGF- β 1 マウス由来のグリア環境では、末梢血由来のリンパ球が減少し、グリア細胞が産生する神経栄養因子 IGF-1 の発現が低下した。従って、TGF- β 1 は、グリア細胞と T リンパ球による神経保護環境を抑制することで ALS マウスの進行を加速することが考えられた (Endo et al. Cell Reports, 2015)。これらの知見をふまえた実験的治療として、TGF- β シグナル阻害剤

(SB-431542)を発症後(120日齢)のSOD1^{G93A}マウスに投与するとその生存期間が有意に延長することを見いだした(生存期間:+9.1日、罹病期間を18%延長)。

さらに、TGF- β シグナル阻害剤を投与したALSマウスの脊髄では、グリア細胞が産生する神経栄養因子IGF-1の発現が一部回復していることを見いだした。また、発症前(60日齢)から阻害剤投与を試みたが、発症時期が早くなり病態の悪化が認められたことから、TGF- β シグナル阻害剤の投与は発症後においてのみ有効であることが判明した。

(2)活性化アストロサイトの病態への関与に関する研究:

自然免疫反応の役割を明らかにするため、自然免疫反応のセンサーであるToll様受容体のアダプター分子TRIFを欠損したALSマウスを作成して解析した。TRIFを欠損した場合にのみALSマウスの生存期間が著しく短縮し、グリア細胞の一種であるアストロサイトが異常活性化して病巣に蓄積した。TRIFが正常な場合、異常アストロサイトは一定数発生するもののアポトーシスにより排除されたが、TRIF欠損では、その除去が不十分で、運動神経周囲の環境を悪化させることにより、ALSの病態を悪化させることが判明した。本研究により、ALSの病巣で異常に活性化したアストロサイトの除去に自然免疫分子TRIFが関与することを見出し、異常活性化グリア細胞の排除メカニズムを明らかにした(Komine et al. *Cell Death Differ*, 2018)。

(3)ALSのアストロサイトにおける発現異常遺伝子の網羅的解析:

上述の発症後の変異SOD1マウスの脊髄に発現するmRNAの網羅的同定をマイクロアレイによって行い、これまでに取得している孤発性ALS脊髄における遺伝子発現異常と共通し、アストロサイト機能に関与すると考えられる遺伝子を複数同定した。これらの知見を、アストロサイトの機能制御を標的とした新たな治療法開発への手がかりとする。また、本研究を通じて、ミクログリア、アストロサイトを生体脳、脊髄から磁気細胞分離法によって単離する技術を確立した。これらの研究手法や遺伝子データベースは、今後のALS病態研究の基盤となるものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計12件)

1. Endo F, Komine O, Fujimori-Tonou N, Katsuno M, Jin S, Watanabe S, Sobue G, Dezawa M, Wyss-Coray T, *Yamanaka K. Astrocyte-derived TGF- β 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with the neuroprotective functions of microglia and T cells.

Cell Reports, 11:592-604, 2015. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.053. 査読有

2. Heneka MT, Yamanaka K (37名中16番目), Kummer MP. Neuroinflammation in

Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, 14: 388-405, 2015. 査読有

doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.

3. Endo F, *Yamanaka K. Astrocytic TGF- β 1: detrimental factor in ALS. *Oncotarget*, 6: 15728-9, 2015. doi:10.18632/oncotarget.4786 査読有

4. Komine O, *Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Nagoya J Med Sci*, 77: 537-549, 2015. 査読有

5. Lasiene J, Komine O, Fujimori-Tonou N, Powers B, Endo F, Watanabe S, Jin S, Ravits J, Horner P, Misawa H, Yamanaka K*. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta Neuropathol Commun* 4: 15, 2016. 査読有

doi: 10.1186/s40478-016-0286-7.

6. Endo F, Komine O, *Yamanaka K. Neuroinflammation in motor neuron disease. *Clin Exp Neuroimmunol* 7: 126-138, 2016. doi: 10.1111/cen3.12309 査読有

7. Yamanaka K, Komine O. The multi-dimensional roles of astrocytes in ALS. *Neurosci Res*, 126: 31-38, 2018.

doi: 10.1016/j.neures.2017.09.011. 査読有

8. Watanabe-Matsumoto S, Moriwaki Y, Okuda T, Ohara S, Yamanaka K, Abe Y, Yasui M, *Misawa H. Dissociation of blood-brain barrier disruption and disease conditions revealed with aquaporin-4-deficient mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Res*, in press, doi: 10.1016/j.neures.2017.11.001. 査読有

9. Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Koike M, Jin S, Moriwaki Y, Endo F, Watanabe S, Uematsu S, Akira S, Uchiyama Y, Takahashi R, Misawa H, *Yamanaka K. Innate immune adaptor TRIF slows disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes. *Cell Death Differ*, in press, doi: 10.1038/s41418-018-0098-3 査読有

10. 山中宏二. 神経・グリア連関に着目した神経変性疾患の病態解明. *日本神経精神薬理学雑誌* (Jpn.J.Neuropsychopharmacol.) 37(4): 109-114, 2017. 査読なし

11. 遠藤史人, 山中宏二. 筋萎縮性側索硬化症におけるグリア病態・神経炎症. *神経治療学* (日本神経治療学会誌) 34: 79-85, 2017. 査読なし

12. 山中宏二. グリア細胞からみた運動神経変性機序. *Dementia Japan* (日本認知症学会誌) 31: 258-264, 2017. 査読なし

[学会発表](計13件)

1. Komine O, Yamashita H, Fujimori-Tonou N, Uematsu S, Akira S, Yamanaka K. Innate immune adaptor TRIF slows disease

progression of ALS mice by eliminating aberrantly activated astrocytes. 28th International symposium on ALS/MND, 2017.12, Boston. (Poster)

2. Endo F, Kurita T, Yamanaka K. Astrocyte-derived extracellular vesicles contribute to the propagation of pathogenic protein in ALS. XXIII World Congress of Neurology(第 23 回世界神経学会), 2017. 9, Kyoto. (Poster)

3. 山中宏二. ALSにおける細胞群特異性病態と治療への展開. 第 39 回日本生物学的精神医学会, 第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会シンポジウム, 2017. 9, 札幌.

4. 山中宏二. 筋萎縮性側索硬化症におけるグリア細胞・神経炎症の役割. 千里ライフサイエンスセミナー, 神経変性疾患の最前線(グリア細胞と神経疾患)2017. 9, 豊中市.

5. 山中宏二. 運動神経変性におけるグリア細胞・神経炎症の役割. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)ワークショップ, 2017. 12, 神戸.

6. 山中宏二. グリア細胞からみた神経変性疾患. 第 39 回日本神経科学大会, Educational Lecture, 2016. 7. 横浜

7. 山中宏二. 神経・グリア連関に着目した神経変性疾患の病態解明. 第 62 回脳の医学・生物学研究会, 2017. 2. 名古屋

8. 山中宏二. Pathomechanisms and therapeutic directions common to motor neuron diseases. 第 56 回日本神経学会学術大会シンポジウム, 2015. 5. 新潟

9. 山中宏二. グリア細胞からみた神経変性メカニズム. 千里ライフサイエンスセミナー「脳内環境の破綻としての疾患研究フロンティア」2015.7. 豊中

10. Yamanaka K. The role of astrocyte-derived TGF- in motor neuron disease. International Society for Neurochemistry Biennial Meeting, 2015. 8. Cairns, Australia (ワークショップ)

11. 山中宏二. グリア細胞からみた運動神経変性機序. 第 34 回日本認知症学会学術集会, シンポジウム, 2015.10. 青森

12. 山中宏二. Active roles of glial cells in motor neuron disease. 第 20 回グリア研究会, 2015. 12. 名古屋

13. Endo F, Komine O, Wyss-Coray T, Yamanaka K.: Astrocyte-derived TGF- 1 accelerates disease progression in ALS mice by interfering with neuroprotective functions of microglia and T cells. 9th Brain Research Conference. 2014. 11, Washington DC, USA.

〔図書〕(計 1 件)

1. 山中宏二. 運動神経疾患におけるグリア細胞の関与 Annual Review 神経(中外医学社) 2016, pp28-34, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.riem.nagoya-u.ac.jp/4/mnd/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山中 宏二 (YAMANAKA Koji)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 80446533

(2) 研究分担者

三澤 日出巳 (MISAWA Hidemi)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号: 80219617

高橋 英機 (Takahashi Eiki)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・支援ユニットリーダー
研究者番号: 40446521

内匠 透 (Takumi Toru)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・シニアチームリーダー
研究者番号: 00222092

小峯 起 (Komine Okiru)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 00456211

(3) 連携研究者

錫村 明生 (Suzumura Akio)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 50196896

竹内 英之 (Takeuchi Hideyuki)
横浜市立大学・医学部・准教授
研究者番号: 30362213

高橋 良輔 (Takahashi Ryosuke)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 90216771

山下 博史 (Yamashita Hirofumi)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号: 60402913

(4) 研究協力者

遠藤 史人 (Endo Fumito)
名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

渡邊 征爾 (Watanabe Seiji)
名古屋大学・環境医学研究所・助教