

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893184

研究課題名(和文)オリゴデンドロサイトのコネクシン蛋白に注目したALSの病態解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Roles of oligodendrocytic connexins in the pathogenesis of ALS

研究代表者

小早川 優子 (Kobayakawa, Yuko)

九州大学・大学病院・学術研究員

研究者番号：40733788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前、ALSモデルマウス脊髄では進行期にオリゴデンドロサイトのコネクシン蛋白(Cx32, Cx47)の発現が障害されていることを報告しており、本研究ではオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)からオリゴデンドロサイトへの分化、およびCxの裏打ち蛋白ZO-1(Zonula occludens-1)に注目した。培養OPCからオリゴデンドロサイトへの分化には、野生型マウスと変異SOD1 Tgマウス間で差を認めなかった。一方変異SOD1 Tgマウスでは発症以前にオリゴデンドロサイトのCx47と共存するZO-1の発現が低下しており、進行期のCx47発現異常の原因となっている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Connexins (Cxs) are transmembrane-type proteins, they form gap junctions between cells and allow direct intercellular communications. In nervous system, glial Cxs especially play a key role in energy supply to neurons. We previously reported that expression of oligodendrocytic Cxs are impaired in ALS model mice at late disease stage. We used cultured oligodendrocyte precursor cell (OPC) from wild-type and mutant SOD1 Tg mice, and examined differentiation to oligodendrocyte and expression of Cxs. There were no difference between wild-type and mutant SOD1 Tg mice. Zonula occludens-1 (ZO-1) protein is scaffolding proteins providing the structural basis for the gap junction. In mutant SOD1 Tg mice at early disease stage, expression of Cx47 was maintained but ZO-1 expression was decreased. Our result suggest that disruption of ZO-1 might lead to impaired expression of Cx47 and associate with motor neuron degeneration in ALS.

研究分野：神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 コネクシン オリゴデンドロサイト 変異SOD1マウス

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)の運動神経変性は、細胞体の死に先行して軸索変性がおこるとされており、軸索機能の保護がALSの病態改善につながると考えられる。中枢神経内で軸索機能を保つために重要な役割を担っているのが、アストロサイトとオリゴデンドロサイトであり、アストロサイトに発現するCx30・Cx43、オリゴデンドロサイトに発現するCx32・Cx47はグリア細胞間でgap junctionを形成し、エネルギーやイオン等の細胞間輸送を担っている。またオリゴデンドロサイトはモノカルボン酸輸送体(monocarboxylate transporter1, MCT1)を通じて神経軸索に栄養を供給する。つまりアストロサイト-オリゴデンドロサイト間、オリゴデンドロサイト-軸索間の連絡が、軸索機能の維持に必須と考えられる。当研究室では、ALSモデルマウスである変異SOD1(G93A) Tgマウスにおいて、脊髄灰白質のオリゴデンドロサイトに発現するCx47とCx32が病態進行とともに広汎な発現異常を生じていることを報告している(Cui Y et al, *J Neuroinflammation* 2014)。また変異SOD1 Tgマウスではオリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte precursor cell, OPC)が増加している(Kang S et al, *Neuron* 2010)ものの、一般的にOPCはCx32・Cx47の発現が低いことが報告されている(Kleopa KA et al, *Acta Neuropathol* 2012)。これらのことから、ALSではOPCからオリゴデンドロサイトへの正常な分化が障害され、Cx32・Cx47の発現異常をきたし、gap junctionを介したアストロサイト-オリゴデンドロサイト間のエネルギー輸送が破綻するために、軸索変性が増悪しているという仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では、ALSモデルマウスにおいて進行期にオリゴデンドロサイトのCx蛋白発現異常をきたす原因を明らかにするため、変異SOD1(G93A)がOPCからオリゴデンドロサイトへの分化やCx47の発現にどのような影響をおよぼすのか、およびCx蛋白の構造的支持蛋白であるZO-1(Zonula occludense-1)に注目し研究を行った。

3. 研究の方法

(1)変異SOD1(G93A)をもつOPCの分化の観察；野生型マウスと変異SOD1(G93) Tgマウス

の新生仔マウスの脳からneurosphereとして神経幹細胞を培養し、OPCからオリゴデンドロサイトへの分化、Cx32・Cx47の発現について観察した。

(2)ALSモデルマウスでCx32・Cx47発現異常をきたす原因の検索；Cx蛋白の裏打ち蛋白であるZO-1(Zonula occludense-1)に注目し、マウス脊髄の免疫染色によりオリゴデンドロサイトのCx32・47の発現変化とZO-1との関係を調べた。

4. 研究成果

(1)neurosphere法として神経幹細胞を培養し、OPCへと誘導したのちオリゴデンドロサイトへの分化を誘導した(図1, 2)。野生型の新生仔マウスと変異SOD1(G93A) Tgの新生仔マウスとの脳とでは、神経幹細胞の増殖やOPC、オリゴデンドロサイトへの分化の程度に差を認めなかった。またCx32・Cx47の発現についても2群間で有意な差を認めなかった(図3)。以上のことから変異SOD1(G93A) TgマウスにおけるOPCの分化異常やCx32・Cx47の発現異常は、ALSの進行の過程で神経幹細胞へ何らかのストレスがくわわることで生じるものと考えられた。

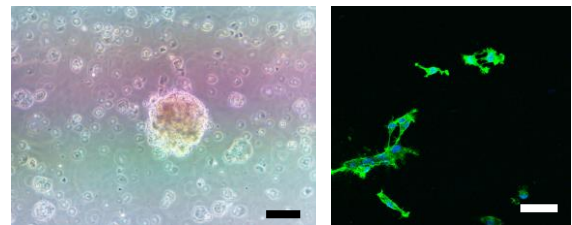


図1
(左)マウス新生児脳から培養した神経幹細胞塊(neurosphere)。
(右)オリゴデンドロサイト前駆細胞。緑；NG2，青；DAPI。
Scale bar; 100 μm(左), 50 μm(右)

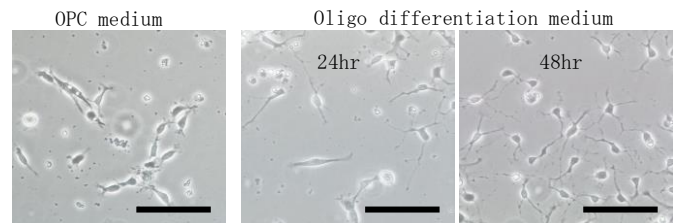


図2
オリゴデンドロサイト前駆細胞からオリゴデンドロサイトへの分化。Scale bar; 100 μm

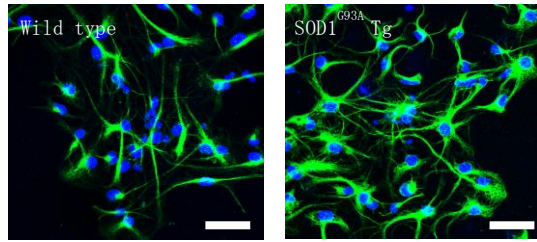


図 3

分化 48 時間後の Cx47 の発現。緑 ; Cx47, 青 ; DAPI。 Scale bar ; 50 μm

(2) 野生型マウスの脊髄において、Z0-1 はおもに血管内皮とグリア細胞表面に発現していた(図 4)。グリア細胞に発現する Z0-1 はオリゴデンドロサイトの Cx47 と共存しており(図 5)、Z0-1 は Cx47 を構造的に維持していると考えられた。Cx32 との共存およびアストロサイトでの発現は認めなかった。発症初期(15 週齢)の変異 SOD1 (G93A) Tg マウスの脊髄では、Cx47 の発現はたもたれているものの、共存する Z0-1 の発現が低下していた(図 6)。Cx47 の発現異常は進行期にみられるが、Z0-1 の発現低下が先行しておこっていることから、Z0-1 の脱落が Cx47 の発現異常を引き起こしている可能性が示唆された。

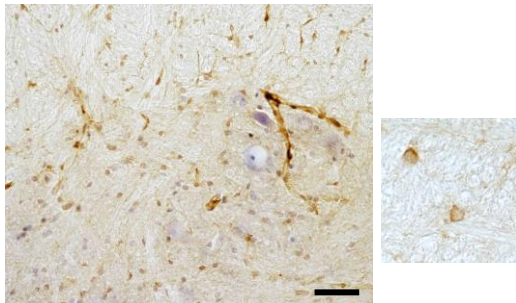


図 4

野生型マウス脊髄での抗 Cx36 抗体を用いた免疫化学染色。 Scale bar ; 50 μm

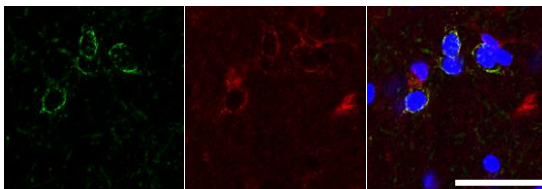


図 5

野生型マウスでは Cx47 と Z0-1 が共存。 緑 ; Cx47, 赤 ; Z0-1。 Scale bar ; 50 μm

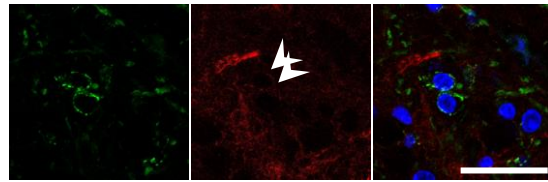


図 6

発症初期(15 週齢)の変異 SOD1 (G93A) Tg マウスでは Cx47 の発現は保たれるものの、Z0-1 の発現が低下。 緑 ; Cx47, 赤 ; Z0-1。 Scale bar ; 50 μm

現在オリゴデンドロサイト特異的 Cx47 コンディショナルノックアウトマウスを作成中であり、変異 SOD1 (G93A) Tg マウスとの交配により、Cx47 脱落が ALS の神経変性に及ぼす影響を検討する予定である。

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)

① Yuko Kobayakawa, Kunihiko Sakumi, Kosuke Kajitani, Toshihiko Kadoya, Hidenori Horie, Jun-ichi Kira, Yusaku Nakabeppu. Galectin-1 deficiency improves axonal swelling of motor neurons in SOD1^{G93A} transgenic mice. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. 41 (2):227-244, February, 2015. 査読有

② 小早川優子, 吉良潤一. 難病新法元年を迎えて. *日本在宅医学会雑誌*. 第 17 巻第 2 号 23-26. 2016. 1.

[学会発表] (計 2 件)

① 小早川優子, 眞崎勝久, 山崎亮, 吉良潤一. Z0-1 as a scaffolding protein of gap junction is impaired in ALS model mice. 第 56 回日本神経学会学術大会 2015. 5. 21. 新潟県新潟市.

② 小早川優子, 山崎亮, 眞崎勝久, 白石渉, 吉良潤一. Involvement of electrical synapse in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. 第 57 回日本神経学会学術大会 2015. 5. 20. 兵庫県神戸市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小早川優子 (KOBAYAKWA Yuko)
九州大学・大学病院・学術研究員
研究者番号：40733788

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 研究連携者

()

研究者番号：