

2008年2月4日

独立行政法人 理化学研究所

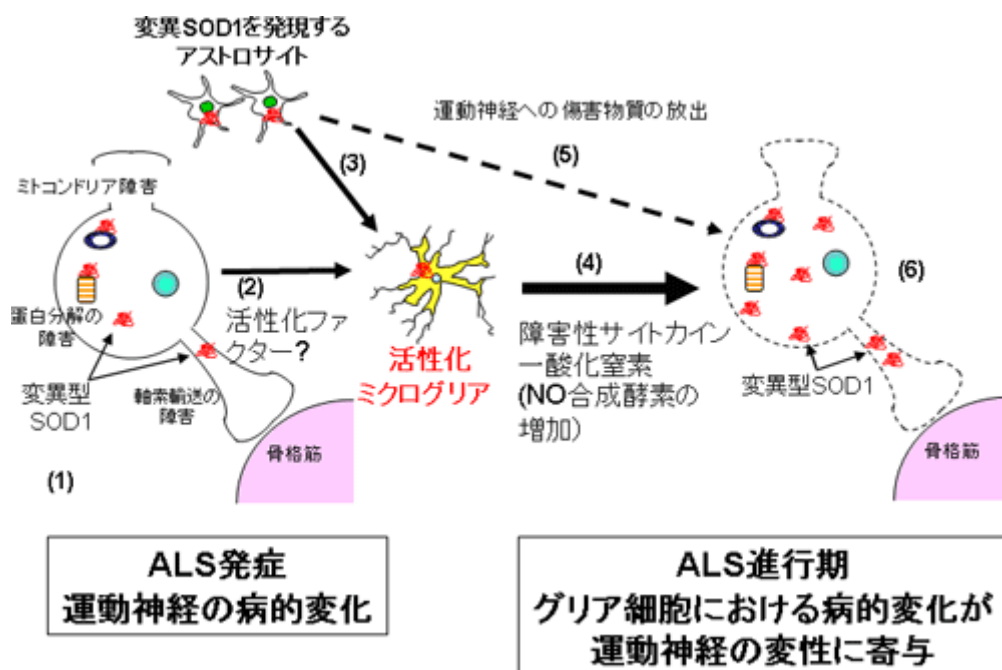
筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行に二つのグリア細胞が関与することを発見

- 神経難病の一つである ALS の治療法の開発につながる新知見 -

原因不明の神経難病「筋萎縮性側索硬化症（ALS）」は、全身の筋肉をコントロールする大脳や脊髄にある運動神経細胞が徐々に死に、動けなくなる病気です。発症すると、思考能力や感覚を失わないまま、全身の筋肉が麻痺し、寝たきりになります。2～5年後には呼吸系の筋肉麻痺のため、人工呼吸器が欠かせない状態となります。

この病気は、侵された運動神経細胞を修復しない限り、根本的な治療が難しいですが、幹細胞を移植しても軸索の成長が遅いことや、神経ネットワークを正しく形成するかという難問が解決されていません。

理研脳科学総合研究センターの山中研究ユニットは、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校、京都大学、共立薬科大学と共同で、ALS のモデルマウスを使って、病気の進行に二つのグリア細胞「アストロサイト」と「ミクログリア」が深く関与していることを発見しました。二つの細胞の増殖や病的変化を組織学的に調べた結果、これら二つのグリア細胞の病的変性（ALS で見つかった原因遺伝子「SOD1」の変異の発現）が、ALS の進行を促進し、取り除くと進行を遅くすることがわかりました。本研究成果は、ALS の進行を食い止める ALS 治療法の開発につながると期待されます。



2008年2月4日
独立行政法人 理化学研究所

筋萎縮性側索硬化症（ALS）の進行に二つのグリア細胞が関与することを発見

- 神経難病の一つである ALS の治療法の開発につながる新知見 -

◇ポイント◇

- ・新しい遺伝型 ALS モデルマウスを用いて ALS 病態の進行メカニズムを解明
- ・グリア細胞であるアストロサイトとミクログリアの異常が ALS の進行に関与
- ・2種類のグリア細胞を標的とした ALS の進行を遅らせる治療法の開発に期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、神経変性疾患の一つで、全身の運動麻痺を起こす神経難病である筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデルマウスを用いて、ALSの進行に関与する細胞群を発見しました。理研脳科学総合研究センター（甘利俊一センター長）山中研究ユニットの山中宏二ユニットリーダーらと、米国・カリフォルニア大学サンディエゴ校、京都大学、共立薬科大学の共同研究による成果です。

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、全身の筋肉を支配する大脳と脊髄にある運動神経細胞が、徐々に死んでいく原因不明の神経難病です。発症すると、認知や思考の能力が保たれたまま、全身の筋肉の麻痺が進行し、寝たきりとなります。通常は、発症から2年ないし5年で、呼吸をつかさどる筋肉の麻痺のため、人工呼吸器なしには生存できなくなる重篤な疾患です。

研究グループはこれまでに、ヒトの遺伝型ALSで発見されたSOD1遺伝子^{*1}の変異を、特定の細胞群で、選択的に除去できる新しいモデルマウスを開発し、ALSに関与するすべての細胞群の働きを検討してきました。今回、このモデルマウスを用いて、ALSの治療の標的となる細胞群の同定を行いました。その結果、脳内で神経細胞とともに存在するグリア細胞の一つであるアストロサイトに発現している変異SOD1を取り除くことにより、ALSの進行と運動ニューロンの細胞死を顕著に遅らせることができることを発見しました。また、アストロサイトは、神経系にある別の種類のグリア細胞であるミクログリアに起因する異常な炎症反応を制御していることを突き止め、このことがALSの病態進行に重要な役割を果たしていることを解明しました。グリア細胞は、神経細胞が緻密な脳のネットワークを作る際、これを補佐する脇役と考えられてきましたが、最近の研究では、脳内で重要な働きをしていることが次々とわかってきています。ALSの進行を遅らせる治療の標的として、運動神経ではなく、グリア細胞であるアストロサイトとミクログリアが有効であることを世界で初めて示した画期的な知見です。

今回の成果を踏まえ、グリア幹細胞を移植する方法などによる、ALSの治療法の開発に大きく寄与することが期待されます。本研究成果は、英国の科学雑誌『*Nature Neuroscience*』オンライン版（2月3日付け：日本時間2月4日）に掲載されます。

* 本研究は、文部科学省科学研究費、上原記念生命科学財団、公益信託「生命の彩」ALS 研究助成基金より研究助成を受けて行われました。

1. 背景

ALSは、全身の筋肉を支配する運動神経細胞を選択的、かつ進行的に障害し、呼吸筋を含む全身の筋肉麻痺を引き起こす原因不明の神経変性疾患です。現在のところ、有効な治療法は見つかっていません。現在、日本では約6,000人のALS患者がいると推定されています。患者の苦痛に加え、介護者にも長期にわたる重度の介護が必要となるため、その原因の解明と治療法の開発が強く求められている疾患です。

ALSにおいて最も特徴的な病変は、運動神経に起こる細胞死ですが、その周囲に存在するグリア細胞でも病的変化がみられます。これまでグリア細胞の病的変化は、神経変性に伴い2次的に起こる変化であるのか、ALS病態に積極的に関与するものであるのかは明らかになっていませんでした。ALSの約1割は遺伝性です。遺伝性ALSでは、原因遺伝子を手がかりとしてモデル動物を作成するなどといった遺伝子工学的手法を用いて研究を行うことが可能であるため、遺伝性ALSをターゲットとして病態解明に向けた研究が進められています。最近の研究成果として、ヒトの遺伝性ALSでは、SOD1遺伝子の優性変異が最も多く、2割の患者で見られることがわかっています。

変異型ヒトSOD1遺伝子を導入したマウスは、ヒトALSの病態をよく再現していることから、モデル動物として広く研究に利用されています。このSOD1遺伝子は、神経細胞やグリア細胞をはじめとした全身のいたるところの細胞に発現しているにも関わらず、運動神経に選択的に細胞死を引き起こすことが知られています。しかしながら、これまでALSの発症や進行に関与する細胞群は、よく知られていませんでした。

研究グループは、特定の細胞群から選択的に変異型のSOD1を除去できる新たなモデルマウス「LoxSOD1^{G37R}」を作成し、ALSに関与するすべての細胞群の関与を明らかにする研究を進めてきました。その結果、グリア細胞の1種であるミクログリアがALS進行に関与する細胞群であることを明らかにしました(Boillee & Yamanaka et al, Science, 2006)。しかし、その進行メカニズムは未解明であり、さらに神経系で最も主要なグリア細胞であるアストロサイトがALSの病態に寄与しているかどうかは、未解決の問題として残されていました。

2. 研究手法と成果

研究グループは、特定の細胞群から選択的に変異型のSOD1を除去することができる新たなモデルマウス「LoxSOD1^{G37R}」と、運動神経およびアストロサイトだけに選択的にCreタンパク質^{*2}を発現するマウスを交配することにより、変異型SOD1を運動神経、あるいはグリア細胞の一つであるアストロサイトから除去したモデルマウスを作成し、疾患の発症時期/生存期間/罹病期間(疾患の進行)^{*3}を調べました(図1)。

次に、アストロサイトから変異型SOD1を除去したモデルマウスを用いて、アストロサイトやミクログリアに的を絞って、これらの細胞の増殖や病的変化を組織学的に調べました。アストロサイトやミクログリアのグリア細胞では、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)^{*4}を発現し、薬物を用いた刺激などによって過剰に一酸化窒素を放出し、神経細胞に障害を来すことが知られています。今回作成したモデルマウスにおいて、これらのグリア細胞のいずれかで、疾患の進行期にiNOSを発現し

ていないかについても検討しました。

その結果、以下のことが明らかになりました。

(1) 運動神経で変異型 SOD1 を除去した場合 (図 1 : 実験 1)

運動神経において変異型 SOD1 を除去すると、ALS モデルマウスの発症時期が約 50 日遅延し、生存期間が約 42 日延長しましたが、罹病期間の延長は見られませんでした。

(2) アストロサイトで変異型 SOD1 を除去した場合 (図 1 : 実験 2)

ALS モデルマウスの発症時期にほとんど変化はありませんでしたが、進行を著明に遅延させることでその生存期間を約 60 日延長しました。罹病期間は約 2.2 倍延長しました (未除去群の約 39 日に対し、除去群では約 87 日)。このことは病気の進行を遅らせることができたことを意味しています (図 2)。

(3) アストロサイトにおいて変異型 SOD1 を除去したモデルマウス

アストロサイトにおいて変異型 SOD1 を除去した ALS モデルマウスの脊髄病巣では、ミクログリアの増殖や活性化が著しく抑制され (図 3)、Cre タンパク質を発現しているアストロサイト (変異型 SOD1 が除去されて正常化したアストロサイト) が多い環境では、活性化ミクログリアは少なくなっていました (図 4)。

(4) 一酸化窒素を産生している細胞はミクログリア

ALS モデルマウスの脊髄病巣で主に一酸化窒素を産生している細胞は、ミクログリアでした。

以上のことから、運動神経における変異型 SOD1 による毒性^{*5}は、ALS の発症に強く関与し、アストロサイトに発現する変異型 SOD1 による毒性は、ALS の進行に積極的に寄与していることが明らかになりました。変異型 SOD1 を有するアストロサイトがミクログリアに病的変化を起こし、ミクログリアから一酸化窒素や炎症性のサイトカイン^{*6}などの神経障害性の物質を放出することにより、運動神経を傷害するため、ALS の病態がさらに進行すると考えられます。このことは、運動神経死と疾患の進行が、これら 2 種類のグリア細胞 (ミクログリアとアストロサイト) に由来する病的変化に強く影響され、これらを正常化することによる ALS 治療の可能性を実験的に証明したことになります (図 5)。

3. 今後の期待

本研究で得られた知見は、ALS の進行を遅らせる標的として、運動神経ではなく、グリア細胞が有効であることを示す画期的なものです。また、このようなグリア細胞の病的変化は、ALS の大部分を占める非遺伝性 ALS でもみられます。ALS の治療は、当然ながら患者が病気を発症してから行われるため、病気の進行を遅らせることが唯一の治療法であり、その点で、ALS の疾患進行に深く関与するグリア細胞は、遺伝性のみならず、すべての ALS 患者の治療の標的細胞として有望であると考えられます。

今後の研究の方向性としては、グリア細胞に起こる分子病態を明らかにして、治療の標的となる分子を同定することを目指しています。また、グリア細胞を健康にする別の方法として、幹細胞移植などが考えられます。ALS の治療において、運動

神経そのものを、幹細胞などを用いて移植する方法は、移植した神経が正しいネットワークを形成するかという点と、軸索伸長速度が遅い（約 1m の軸索を再生させるには約 2 から 3 年を要する）という点で困難を抱えています。これに対し、グリア細胞を標的とした幹細胞治療や、薬剤投与などの方法は、運動神経ではなく、その周囲の非神経細胞であるグリア細胞を正常化することから、神経細胞を用いた方法よりも簡便であるため、有効な ALS 治療の開発につながると期待されます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター 山中研究ユニット

ユニットリーダー 山中 宏二 (やまなか こうじ)

Tel : 048-467-9677 / Fax : 048-462-4796

脳科学研究推進部 嶋田 庸嗣 (しまだ ようじ)

Tel : 048-467-9596 / Fax : 048-462-4914

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 SOD1 遺伝子(スーパーオキシドジスムターゼ遺伝子)

酸素に依存する生物の細胞内で発生する有害な活性酸素であるスーパーオキシドを解毒する反応系を触媒する酵素がスーパーオキシドジスムターゼである。遺伝型の ALS では、この遺伝子に変異が見られる。

※2 Cre タンパク質

大腸菌に由来する酵素。特定の DNA 配列 (Lox 配列と呼ばれる) を認識し、その間にある DNA を除去する。特定の細胞群における遺伝子の働きを調べる目的で、Cre タンパク質を細胞群選択的に発現するマウスが研究によく使われている。

※3 発症時期／生存期間／罹病期間(疾患の進行)

発症時期 : ALS の症状を示し始めた時期 (本研究では体重減少の開始点)

生存期間 : モデルマウスの誕生から死亡までの期間

罹病期間 : 発症時期から死亡までの期間 (=生存期間ー発症時期)

罹病期間が延長すると、病気の進行が遅延したと考えられる。

※4 誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS: inducible NO synthase)

一酸化窒素合成酵素とは、L-アルギニンを基質として一酸化窒素（NO）が合成される過程で触媒として作用する酵素の総称である。ほ乳類の一酸化窒素合成酵素は3種類あり、神経型（nNOS）、誘導型（iNOS）、血管内皮型（endothelial NOS）が知られている。誘導型 NOS は、平常状態では出現せず、サイトカインの存在下でマクロファージやミクログリアなど種々の細胞で誘導され、産生された一酸化窒素により病原体を殺す生体防御機能の一部を担う。また、組織障害誘発因子としても注目されている。

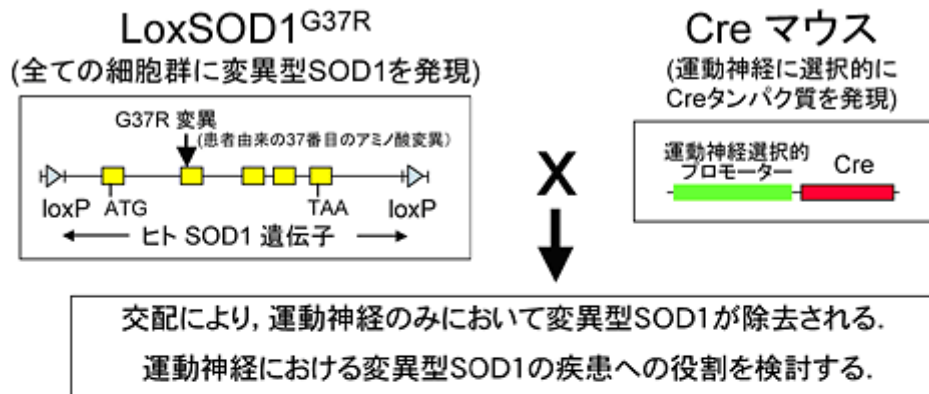
※5 変異型 SOD1 による毒性

遺伝型の ALS では SOD1 遺伝子に変異が見られるが、この酵素の活性が失われるために運動神経の細胞死が起こるのではなく、変異型の SOD1 が酵素活性とは無関係の毒性を発揮することが神経細胞死の原因と考えられている。しかし、現時点でその毒性の詳細は不明である。

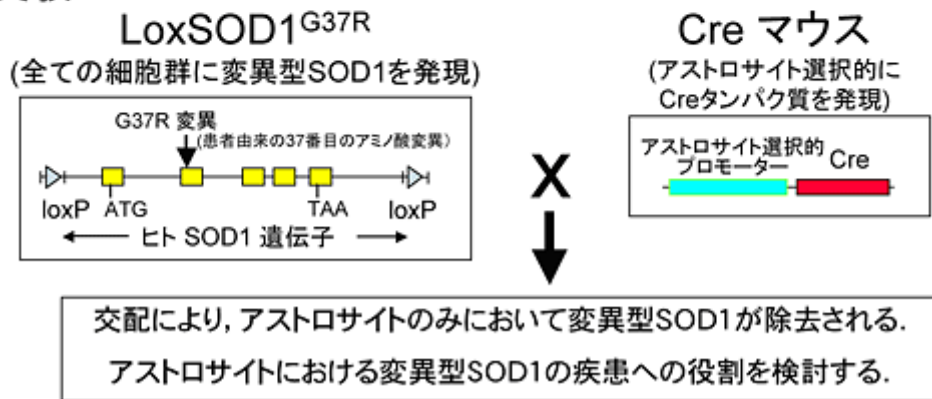
※6 サイトカイン

細胞から分泌されるタンパク質で、特定の細胞に情報伝達をするものをいう。特に免疫、炎症に関係したものが多く、極めて微量でその効果を発揮する。細胞の増殖、分化、細胞死、あるいは創傷治癒などに関係するものがある。

実験1



実験2



- 実験 1 : 新しいALSモデルマウスLoxSOD1^{G37R}と、運動神経において選択的にCreタンパク質を発現するCreマウスを交配する。この交配実験で、変異型SOD1を運動神経のみで除去することによる、ALS発症と疾患の進行時期への効果を検討する。
- 実験 2 : ALSモデルマウスLoxSOD1^{G37R}と、アストロサイトにおいて選択的にCreタンパク質を発現するCreマウスを交配する。この交配実験で変異型SOD1をアストロサイトのみで除去することによる、ALS発症と疾患の進行時期への効果を検討する。

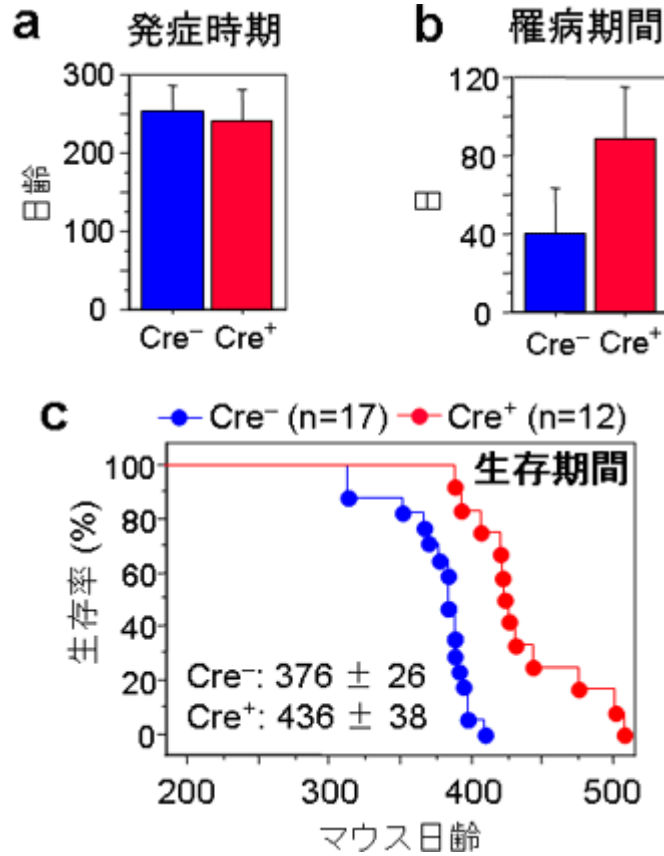


図2 アストロサイトの変異型 SOD1 を除去した ALS モデルマウスの発症時期、生存期間、および罹病期間

ALSモデルマウス (Cre⁻: 青) とアストロサイトから変異型SOD1 を除去したALSモデルマウス (Cre⁺: 赤) における発症時期 (a) と罹病期間 (b)、および生存曲線 (c)。グラフ中に各群の平均生存期間 (平均日数±標準偏差) を示した。Cre⁺では、発症時期に変化がなく、罹病期間が著明に延長していることから、疾患の進行が遅延したことがわかる。

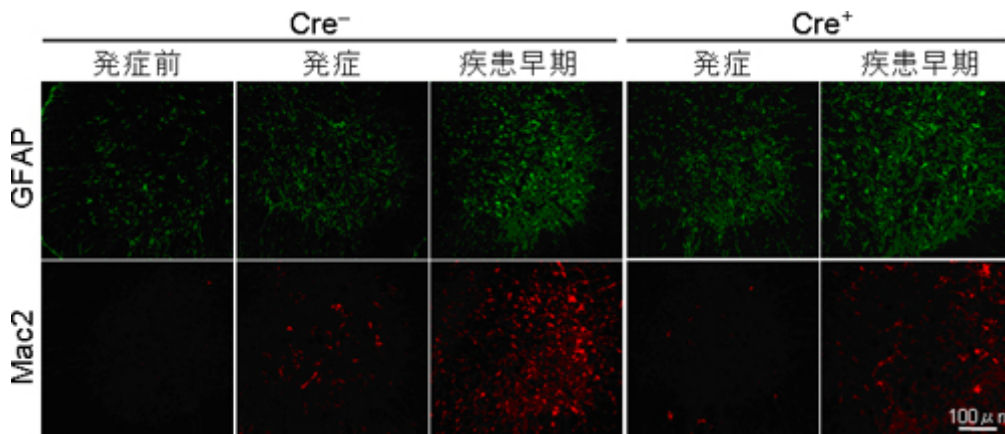


図3 アストロサイトから変異型 SOD1 を除去した場合のミクログリアの活性化

発症前、発症期、疾患早期のALSモデルマウス (Cre^-) およびアストロサイトから変異型SOD1を除去したモデルマウス (Cre^+) の、腰部脊髄におけるアストロサイト (緑: GFAP抗体による染色) と活性化したミクログリア (赤: Mac2抗体による染色)。発症期から疾患の進行につれて見られるミクログリアの活性化が、アストロサイトを正常化することで改善している。

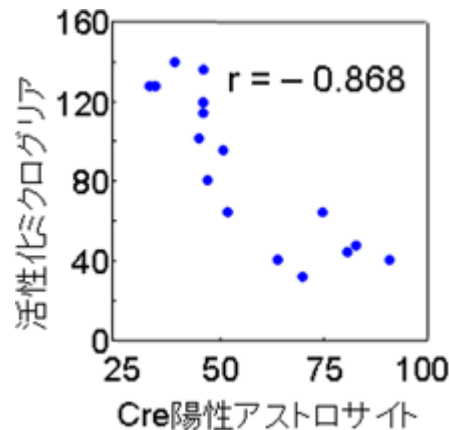


図4 疾患進行期のALSモデルマウスの脊髄病巣におけるアストロサイトでのCreタンパク質の発現と活性化ミクログリアの相関

疾患進行期のALSモデルマウス (アストロサイト Cre マウスと交配したもの) の脊髄病巣における Cre タンパク質を発現しているアストロサイト (変異型 SOD1 が除去されて正常化したアストロサイト) の数と、活性化ミクログリアの数は逆相関している。(ピアソンの相関係数 r は、強い逆相関を示している。)

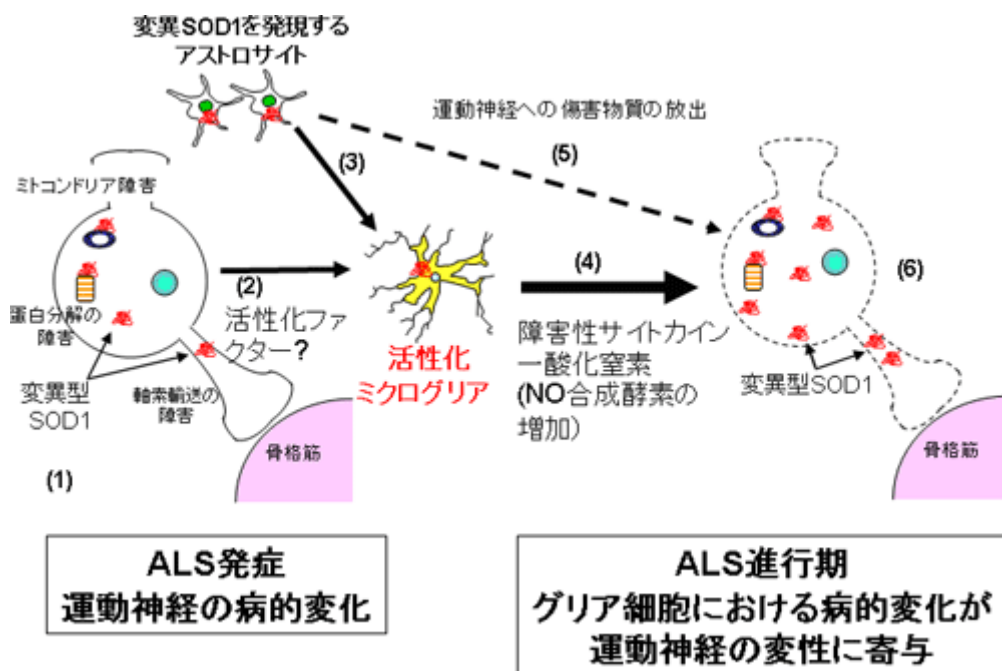


図5 ALSにおけるグリア細胞が寄与する神経細胞死のメカニズム

ALS 発症は運動神経内で起こるさまざまな病的変化の集積によって起こると考えられる (1)。ミクログリアは運動神経からの未知の因子 (2) や変異型 SOD1 を発現したアストロサイトに由来する因子 (3) により強く活性化され、細胞障害性サイトカインや一酸化窒素の放出 (4) によりさらに運動神経を傷害して、疾患の進行に深く関与する。アストロサイトはまた、運動神経を直接傷害する有害因子を放出していることが知られている (5)。運動神経死と疾患の進行は、これら 2 種類のグリア細胞 (ミクログリアとアストロサイト) に由来する病的変化に強く影響され、非細胞自律性の神経細胞死を来すと考えられる (6)。神経変性がグリア細胞から神経栄養因子が失われるために起こるのか、あるいは有害なサイトカインなどの分子によるものであるのかは、今後解明すべき課題である。