

## 筋萎縮性側索硬化症における神経炎症と興奮性神経毒性に関する研究

研究代表者 柴田 亮行<sup>1)</sup>

研究分担者 柿田 明美<sup>2)</sup>、 小林 慎雄<sup>1)</sup>、 高橋 均<sup>3)</sup>

1) 東京女子医科大学病理学第一講座

2) 新潟大学脳研究所デジタル医学分野

3) 新潟大学脳研究所病理学分野

### 研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態における神経炎症と興奮性神経毒性の関与を明らかにするため、剖検脊髄におけるグルタミン酸合成酵素グルタミナーゼのミクログリア特異的アイソフォーム (GAC)、自然免疫に関連する抗原受容体 (TLR2/TLR4) とそのアダプター蛋白 (MyD88) ならびにその下流シグナル伝達物質群の発現を、免疫組織化学染色法とイムノブロット法を用いて解析し、孤発性 ALS 群と年齢一致対照群とで比較した。その結果、GAC、TLR2/TLR4 および MyD88 の発現レベルと下流シグナル伝達物質群のリン酸化活性化レベルが上昇しており、これらは主に活性化ミクログリアに局在していた。以上から、孤発性 ALS において、グルタミン酸合成と自然免疫性炎症活動が高まっていることが判明した。

### A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態における炎症の関与を示唆する間接的証拠は、多くの研究者によって報告されている。我々は、昨年の本研究報告書の中で、炎症促進性ケモカインの一種フラクタルカンとその受容体 CX3CR1 が孤発性 ALS 剖検脊髄で増加し、前者が主に運動ニューロンに、後者が主にミクログリアに局在することを報告した。また、同一のサンプルを用いて、グルタミンをグルタミン酸に転換する酵素グルタミナーゼ (GLS) の増加とミクログリアにおける局在も明らかにした。

本年度我々は、炎症活動とグルタミン酸産生放出に関わる共通のシグナル伝達機構を特定するため、壊死ニューロン由来未知物質の受容体と目される Toll-like receptor 2 (TLR2)、TLR4、myeloid differentiation 88 (MyD88)、phosphoinositol-3 kinase (PI3K)、Akt、nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B)、inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase-alpha/beta (IKK $\alpha$ / $\beta$ ) などに注目し、これらの発現を形態学的ならびに定量的手法を用いて解析し、その結果を孤発性 ALS 群と年齢一致対照

群とで比較した。また、GLS の中胚葉起源細胞特異的アイソフォームとして注目されている GLS-C (GAC) の発現についても、同様の検討を行った。

### B. 研究方法 (倫理面への配慮を含む)

《一次抗体》

免疫組織化学またはイムノブロットに用いた一次抗体は、抗 GAC IgG (Life Span Biosciences)、抗 TLR2 IgG (AbD Serotec (AbD))、抗 TLR4 IgG (AbD)、抗 MyD8 IgG (AbD)、抗リン酸化 PI3K (p-PI3K) IgG (Santa Cruz Biotechnology (SCB))、抗 PI3K IgG (SCB)、抗 p-Akt IgG (SCB)、抗 Akt IgG (SCB)、抗 p-NF- $\kappa$ B IgG (Cell signaling Technology (CS))、抗 p-IKK $\alpha$ / $\beta$  IgG (CST)、抗 IKK $\alpha$ / $\beta$  IgG (CST)、抗 Iba1 IgG (Immunobiological Laboratory (IBL))、抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) IgG (Dako)、抗 III $\beta$  tubulin IgG (abcam)、抗 histone H1 IgG (SCB) および抗 $\beta$ -actin (SCB) であった。これらのうち、III $\beta$  tubulin、GFAP および Iba1 は、それぞれニューロン、アストロサイトおよびミクログリアの細胞マーカーとして用いた。

## 《免疫組織化学》

本研究は新潟大学と東京女子医科大学のそれぞれの倫理委員会の承認を得ており、遺族の同意が得られた剖検例を用いた。孤発性 ALS 群 (n = 10) および年齢一致対照群 (n = 10) の剖検脊髄から作製されたホルマリン固定パラフィン包埋切片または optimal cutting temperature (OCT) compound 包埋新鮮凍結切片に内因性ペルオキシダーゼ活性阻止処理を施した後、一次抗体を反応させて免疫反応産物を polymer-immunocomplex (PIC) 法または蛍光抗体法で可視化した。免疫反応産物の局在は、隣接切片における H&E 染色像や各種細胞マーカーの免疫組織化学染色像ならびに蛍光二重免疫染色像をもとに同定した。

## 《イムノブロット》

各症例の剖検脊髄新鮮凍結ブロック (-80°C 下保存) から、NE-PER<sup>®</sup>キット (Pierce) を用いて核と細胞質の分画蛋白を抽出した。核分画蛋白は p-NF-κB/histone H1 の検出に、細胞質分画蛋白はこれら以外の検出に、それぞれ用いた。各症例の蛋白抽出物に modified Laemli サンプル緩衝液を加えた溶液 (10 μg/Lane) を 10%ドデシル硫酸ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で展開し、電気的に転写した polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜上で一次抗体を反応させ、免疫反応産物を化学発光法で可視化した。免疫活性は CCD カメラでデジタル化し、CS analyzer (ATTO) を用いてその強度を測定した。

## 《統計処理》

イムノブロット上の免疫活性密度を症例ごとに β-actin 値で補正した免疫活性密度比を、ALS 群と対照群の二群間で Mann-Whitney U-test を用いて比較した。P < 0.05 をもって有意差ありと判定した。

## C. 研究結果

### 《解析物質の局在解析》

GAC、TLR2、TLR4、MyD88、p-PI3K、p-Akt、p-IKKα/βおよび p-NF-κB の免疫活性は、主に反応性アストロサイトと活性化ミクログリアの表面を含む細胞体に局在し、運動ニューロンでは微弱であった。この傾向は、対照群と比較して ALS 群では顕著であ

った。GAC の局在は GLS のそれに類似していた。

### 《解析物質の定量解析》

イムノブロット上の免疫活性密度比 GAC/β-actin、TLR2/β-actin、TLR4/β-actin、MyD88/β-actin、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-IKKα/β/IKKα/βおよび p-NF-κB/histone H1 は、対照群と比較して ALS 群で有意に上昇していた (p < 0.01)。

## D. 考察

昨年度呈示した GLS は、遺伝子のほぼ全長を反映した蛋白分子であり、細胞特異的とはいえなかったことから、本年度はミクログリア特異的アイソフォームと言われる GAC に注目した。その結果、GLS と GAC の局在様式に明らかな差異はみいだされなかった。これは、中枢神経組織に発現する GLS の大部分が GAC であることを表している。

今回解析した TLR2 と TLR4 は、自然免疫の代表的受容体であり、これまでに壊死ニューロンに由来する未知の物質の他、尿酸、熱ショック蛋白、フィブリノゲン、フィブロネクチン、ヒアルロナン、リポ多糖、ペプチドグリカンなどがリガンドとして同定されている。TLR2/TLR4 にはアダプター蛋白 MyD88 が結合しており、リガンドが受容体を刺激すると MyD88 の増加を介して下流の炎症促進シグナル伝達経路の活性化を誘導する。その結果、種々の炎症促進性遺伝子産物やグルタミン酸合成酵素の発現が上方調節される実験結果が報告されている。以上の背景を踏まえると、孤発性 ALS 脊髄においてグルタミン酸や炎症性メディエーターが増加している事実は、我々が今回明らかにした自然免疫系分子群 TLR2/TLR4-MyD88 による経路を介した細胞シグナルの結果であると考えられる。

これらの機能分子の制御を目的とした創薬は、ALS の新規治療戦略に貢献するものと期待される。

## E. 結論

ALS において、グルタミン酸合成と自然免疫性炎症活動が高まっていることが判明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

•Shibata N, Kobayashi M, et al. HNE upregulates and phosphorylates cPLA2 in cultured Ra2 microglial cells via MAPK pathways. Neuropathology 31: 122-128, 2011.

•Ito H, Shibata N, et al. Optineurin is co-localized with FUS in basophilic inclusions of ALS with FUS mutation and in basophilic inclusion body disease. Acta Neuropathol 121: 555-557, 2011

## 2. 学会発表

•柴田亮行, 柿田明美, 高橋均, 井原雄悦, 信國圭吾, 川口素子, 猪瀬悠理, 廣井敦子, 山本智子: 筋萎縮性側索硬化症患者におけるグルタミンアーゼ C の役割. 第 53 回日本神経学会総会, 2012 年 6 月 30 日, 新潟 (一般演題口演).

## G.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得: とくになし
2. 実用新案登録: とくになし
3. その他: とくになし