

新潟大学脳研究所  
「脳神経病理標本資源活用の先端的共同研究拠点」  
共同利用・共同研究報告書

## 筋萎縮性側索硬化症における興奮性神経毒性に関する研究

研究代表者氏名 柴田 亮行<sup>1)</sup>  
研究分担者氏名 加藤 陽一郎<sup>1)</sup>  
柿田 明美<sup>2)</sup>  
高橋 均<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>東京女子医科大学病理学第一講座、  
<sup>2)</sup>新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野、<sup>3)</sup>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) の興奮性神経毒性における鉄代謝の関与を明らかにするため、孤発性 ALS 剖検頸部脊髄中の鉄代謝関連蛋白の発現を形態学的ならびに定量的手法を用いて解析するとともに、可溶性鉄分濃度を測定した。その結果、transferrin receptor (TR)、iron-sulfur cluster protein (ISCP)、ferritin heavy chain 1 (FTH1) および ferroportin-1 (FP1) は、主にミクログリアに局在しており、対照群と比較して ALS 群で有意に増加していた。可溶性鉄分濃度も、対照群と比較して ALS 群で有意に増加していた。我々が最近行った、可溶鉄を負荷した培養ミクログリアが細胞内 FTH1 レベル上昇と細胞外グルタミン酸濃度上昇という実験結果を考慮すると、脊髄ミクログリアによるグルタミン酸放出に過剰鉄の関与が示唆される。

### A.研究目的

1990 年代に、質量分析装置を用いた研究で、ALS 患者の脊髄組織に含まれる鉄の増加が指摘されていた。一方、ALS 患者の脳脊髄液中や細胞外液中のグルタミン酸濃度上昇を端緒に基礎的研究知見が蓄積され、運動ニューロン死のグルタミン酸毒性説が提唱されるに至っている。以上を踏まえ、ALS の興奮性神経毒性における鉄代謝の関与を明らかにするため、ALS 剖検頸部脊髄中の鉄代謝関連蛋白の発現を形態学的ならびに定量的手法を用いて解析するとともに、可溶性鉄分の濃度を測定した。

### B.研究方法 (倫理面への配慮を含む)

倫理委員会で研究使用が承認された孤発性 ALS 症例 (n = 10) ならびに年齢一致対照症例 (n = 10) の剖検脊髄から作製保存された新鮮凍結材料とホルマリン固定パラフィン包埋材料をもと

に、ウェスタンブロット法と免疫組織化学染色を用いて、TR、ISCP、FTH1 および FP1 の発現を定量的ならびに形態学的に解析した。使用した一次抗体は、TR (Santa Cruz)、FTH1 (Acris)、ISCP (GeneTex) および FP1 (Novus Biologicals) の各々に対する特異的 IgG であった。ウェスタンブロット解析では、化学発光法により可視化した免疫反応産物の強度を  $\beta$ -actin で補正した免疫活性密度比で症例毎に数値化し、unpaired Student's t-test を用い、ALS 群と対照群で二群間比較した。免疫組織化学的解析では、免疫反応産物をポリマー免疫複合体法により可視化し、ニューロン (MAP2)、アストロサイト (GFAP)、ミクログリア (Iba1) などの細胞マーカーとの二重染色により局在を同定した。さらに、新鮮凍結脊髄組織に含まれる可溶性鉄分の濃度を、可溶鉄の存在下で起こる呈色反応原理を応用した MG Metallogenics 社製の専用キットを用いて定量測定した。

### C.研究結果

ウェスタンブロット解析では、対照群と比較して ALS 群で、TR/ $\beta$ -actin 比正常、FTH/ $\beta$ -actin 比上昇 ( $P < 0.05$ )、ISCP/ $\beta$ -actin 比上昇 ( $P < 0.05$ ) および FP1/ $\beta$ -actin 比正常を示した。免疫組織化学染色では、TR、FTH1、ISCP および FP1 の各免疫活性は、中枢神経系を構成するいずれの細胞にも検出されたが、ALS 群ではミクログリアにおいて染色性が増強していた。脊髄中の可溶性鉄分濃度は、対照群と比較して ALS 群で有意に上昇していた ( $P < 0.05$ )。

### D.考察

ウェスタンブロット解析の結果は、細胞内外を可溶性鉄が移動する過程に関与する蛋白群の発現量に変化が明らかでないのに対し、FTH1 に代表される細胞質の可溶性鉄と ISCP に代表されるミトコンドリアの可溶性鉄が増加していることを示している。免疫組織化学染色の結果は、解析の対象とした 4 種類の鉄代謝関連蛋白の発現が、ALS 脊髄において主にミクログリアで上方調節されていることを示している。脊髄中の可溶性鉄分濃度測定の結果は、上記のウェスタンブロット解析と免疫組織化学的解析の結果が、鉄代謝の異常にもとづくことを支持している。

我々は昨年の共同利用共同研究報告書において、対照群と比較して ALS 群で、グルタミンからグルタミン酸への脱アミノ反応を触媒するミトコンドリア酵素グルタミナーゼの発現レベルが有意に上昇し、本酵素が主にミクログリアに局在することを報告した。一方、我々は最近、培養ミクログリアに細胞毒性の弱いクエン酸アンモニウム鉄を添加すると、一定時間後の培養液中グルタミン酸濃度が有意に上昇することを発見した。予備的な阻害実験により、グルタミンが L-amino acid transporter を介して細胞外から細胞内へ取り込まれ、グルタミナーゼによりグルタミン酸に転換された後、gap junction protein により細胞外へ放出されることが確認された。

これらの事実を総合すると、原因不明の脊髄ミクログリアにおける可溶性鉄の蓄積がグルタミン酸の産生放出を促し、興奮性神経毒性を発揮する機序が想定される。二次運動ニューロン群の

うち、外眼筋支配神経核と Onufcrowcz 核が選択的に運動ニューロン死を免れる理由は、ALS で侵されやすい運動ニューロンで欠乏する代表的なカルシウムイオン緩衝蛋白 (calbindin D-28k と parvalbumin) の発現量が多いという過去の報告 (Alexianu et al, Ann Neurol 1994) に求めた。

### E.結論

孤発性 ALS 脊髄では、原因を特定できないものの、ミクログリアで可溶性鉄の蓄積が起こっていることが明らかになった。可溶性鉄を多く含んだミクログリアから大量に放出されるグルタミン酸が、運動ニューロンに興奮性細胞死を惹き起こす可能性が示唆された。鉄代謝の是正が ALS の予防や治療に繋がるものと期待される。

### F.研究発表

1.論文発表 (掲載誌名・巻号・頁・発行年を記入し、  
掲載論文あるいは PDF ファイルを別紙で 1 部提出)  
論文執筆中

2.学会発表 (学会名・発表年月・開催地なども記入)  
日本神経学会総会

### G.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし