

筋萎縮性側索硬化症における運動ニューロン死に関与する 新規病態分子同定法の確立

小菅 康弘

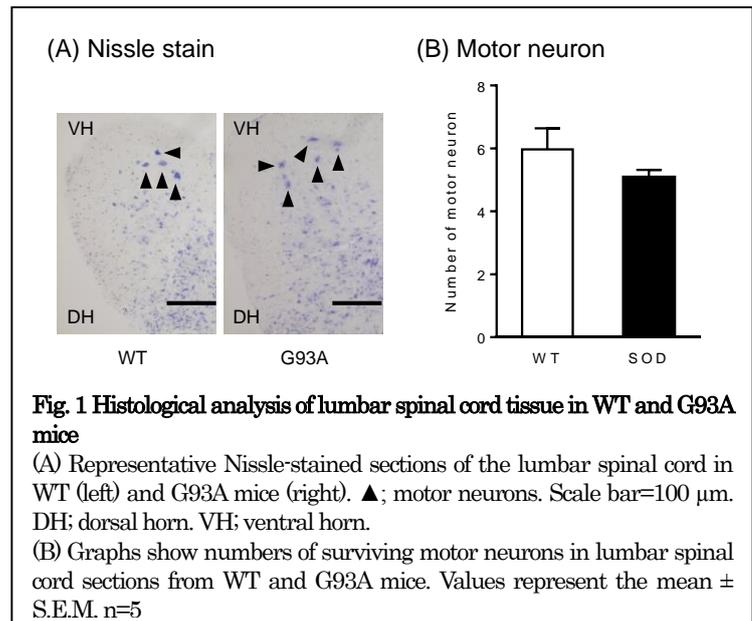
(日本大学薬学部薬理学研究室)

【目的】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンの選択的変性を特徴とする極めて予後不良の神経変性疾患である。ALS の約 90% は孤発性で発症原因は不明であるが、残り 10% の家族性 ALS (fALS) 患者の一部において Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) 1 の点突然変異 (SOD1^{G93A}) が認められている。現在、ALS 発症機構の解明や治療薬の開発研究には、家族性 ALS 患者の一部において認められるこれまでに、この SOD1^{G93A} を過剰発現させたトランスジェニックマウス (G93A) が ALS モデル動物として汎用されている。また、本邦では、神経系のグルタミン酸の産生および再取り込みの調節作用を持つ riluzole のみが唯一認可された治療薬であるが、ALS の進行をわずかに遅延させるだけで、その効果はほとんど期待できないのが実情である。そのため、真に有効な新規治療薬の開発が急務となっている。ALS 研究では、ALS に特徴的に起こる運動ニューロンの変性機構を解明するかがポイントであるため、患者またはモデルマウスの脊髄組織を用いた病態機能分子の検索が行われてきた。しかし、ヘテロな細胞の集まりである脊髄組織において運動ニューロンの数はごくわずかであるため、脊髄組織を用いた研究では、本ニューロンでのみ変化する病態機能分子の同定が困難であるという問題点も挙げられる。

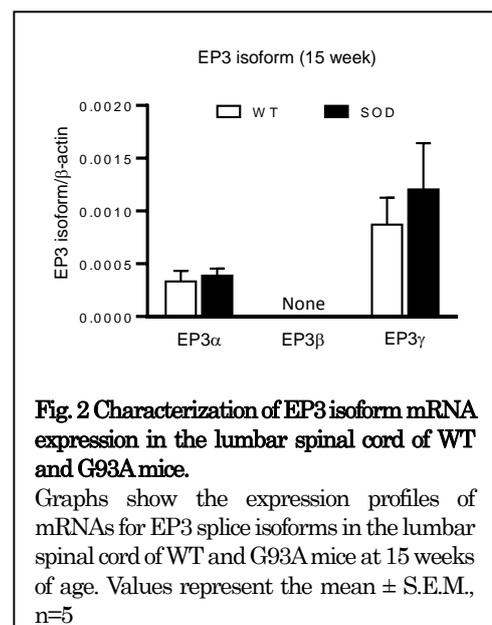
Laser Microdissection (LMD) 法は、顕微鏡下の組織切片上で標的とする細胞のみをレーザー光によって切り出し、採取することのできる有効なツールである。我々の研究グループでは、これまでに、本法を用いた解析から、海馬神経細胞の種類により caspase-12 の発現量が異なることを見出し、この違いが神経細胞の選択的脆弱性の一因となることを報告している¹⁾。そこで、本研究では、この LMD 法を用いた運動ニューロンの分収法を確立するとともに、運動ニューロン選択的に発現する分子の検討を行った。

【方法】実験には、運動機能障害が発症した直後の 15 週齢の B6SJL-TgN (SOD1^{G93A}) ALS モデルマウス (G93A) および同一週齢の C57BL/6J 野生型マウス (WT) を供した。運動ニューロンの同定は、Nissle 染色により行い、腰髄前角に存在する Nissle 陽性細胞のうち直径 20 μ m 以上の細胞を運動ニューロンとした。また、遺伝子の発現解析には、Real time PCR 法を用いた。なお、全ての動物実験は、日本大学薬学部動物実験指針に従った。

【結果および考察】はじめに、15週齢のG93Aおよび同週齢のWTの腰髄前角に存在する運動ニューロンの変化について、神経細胞を選択的に染めるNissle染色を用いて検討した。その結果、いずれの切片においても運動ニューロンは観察された。また、15週齢におけるG93Aの運動ニューロン数は、同週齢のWTと比較しても有意な差は認められなかった (Fig. 1)。そこで、以後の検討には、運動ニューロンが保持されている15週齢のG93AおよびWTを用いた。



近年、ALS患者やG93Aの腰髄において上昇するprostaglandin E₂ (PGE₂)がALSの発症や進行に関与することが報告されている^{2),3)}。PGE₂の受容体であるE-Prostanoid receptor (EP)は、Gタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)であり、4つのサブタイプ(EP1, EP2, EP3, EP4)が存在する⁴⁾。これらのサブタイプは、組織局在、発現パターン、細胞内シグナル伝達経路が異なっているため、PGE₂は生体に多様な生理作用を及ぼす。なかでも、EP3は、C末端部のalternative splicingにより複数のisoformが産生されることが知られており、マウスでは3種類のisoform (EP3α, EP3β, EP3γ)が同定されている⁴⁾。しかし、ALSの責任病巣である腰髄運動ニューロンにおけるEP3の役割については、検証された例が少なく、いまだ不明な点が多い。そこで、マウス腰髄におけるEP3 isoformの発現解析をReal time PCR法により行った。マウス腰髄では、EP3αおよびEP3γ mRNAの発現が認められたが、EP3βの発現は認められなかった。また、15週齢のG93A腰髄におけるEP3αおよびEP3γ mRNAの発現レベルは、同週齢のWTと比較して、顕著な差は認められなかった (Fig. 2)。



さらに、運動ニューロンに存在するEP3 isoformを明らかにするために、Laser

Microdissection (LMD)法を用いて腰髄組織から運動ニューロンのみを回収し(Fig. 3)、Real time PCRを用いた発現解析を行った。その結果、運動ニューロンには、EP3 γ mRNAの発現が認められたものの、EP3 α およびEP3 β の発現は認められなかった。また、G93Aの運動ニューロンにおけるEP3 γ mRNAの発現レベルは、WTのそれと比較して、顕著な差は認められなかった (Fig. 4)。

これまでに、マウスにおいて同定された 3 種類の isoform (EP3 α , EP3 β , EP3 γ)は、同様のリガンド結合特性を持つものの、その下流の細胞内シグナル伝達経路は異なっており、EP3 α および EP3 β は Gi タンパク質と、EP3 γ は Gi または Gs タンパク質とカップリングすることが報告されている⁵⁻⁷⁾。また、Gs タンパク質とカップリングする EP2 をノックアウトした G93A では、生存率の増加、PGE₂ 合成酵素の発現低下が認められ、EP2 を介した PGE₂ シグナリングが ALS における神経変性に関与することが報告されている⁸⁾。さらに、我々の研究グループにおいても、運動ニューロン様細胞である NSC34 細胞は EP2 の活性化を介して細胞死を誘発することを報告している⁹⁾。これらの報告と本研究で示した運動ニューロンには EP3 γ のみが発現することを考えあわせると、G93A において生じる PGE₂ レベルの上昇は、Gs タンパク質とカップリングする EP2 および EP3 γ の活性化を介して、運動ニューロン死を誘発することが示唆された。

以上のように、本研究では、LMD法により病態モデルマウスより運動ニューロンを選択的に分収し、Real time PCR法により発現遺伝子を解析する方法を確立した。また、運動ニューロン特異的に発現するEP3 γ は、ALS治療薬開発の新規標的分子となる可能性が示された。

以上のように、本研究では、LMD法により病態モデルマウスより運動ニューロンを選択的に分収し、Real time PCR法により発現遺伝子を解析する方法を確立した。また、運動ニューロン特異的に発現するEP3 γ は、ALS治療薬開発の新規標的分子となる可能性が示された。

【謝辞】 本研究の一部は、平成 26 年度萌芽探究型研究助成金の支援により行われた。

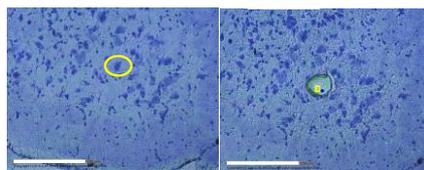


Fig. 3 Dissection of motor neurons from fresh frozen mouse spinal cord sections using a LMD system.

Photograph of representative toluidine blue-stained sections before dissection (left) and after (right) microdissection. A circle indicates the collected motor neurons in the anterior horns of the spinal cord. Scale bar=150 μ m.

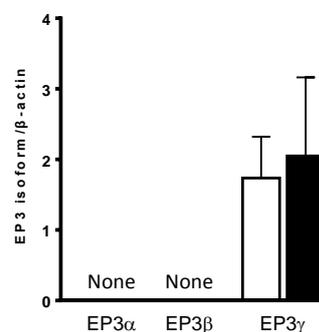


Fig. 4 Distribution pattern of EP3 isoforms in motor neurons of the lumbar spinal cord of WT and G93A mice.

Graphs show the expression profiles of mRNAs for EP3 splice isoforms in the motor neurons of WT and G93A mice at 15 weeks of age. Values represent the mean \pm S.E.M, n=5

なお、本研究の成果は以下の学会および学術論文において発表した。

小菅康弘, 四宮敬史, 石毛久美子, 川口充, 伊藤芳久. マウス脊髄運動ニューロンにおけるプロスタグランジン E2 EP3 受容体アイソフォームの同定. 第 88 回日本薬理学会年会 平成 27 年 3 月 18 日 名古屋

Kosuge Y, Miyagishi H, Shinomiya T, Nishiyama K, Suzuki S, Osada N, Ishige K, Okubo M, Kawaguchi M, Ito Y. Characterization of motor neuron prostaglandin E2 EP3 receptor isoform in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Biol. Pharm. Bull.* In press

【参考論文】

1. Kosuge Y, Imai T, Kawaguchi M, Kihara T, Ishige K, Ito Y. Subregion-specific vulnerability to endoplasmic reticulum stress-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 52:1204-1211, 2008
2. Almer G, Teismann P, Stevic Z, Halaschek-Wiener J, Deecke L, Kostic V, Przedborski S. Increased levels of the pro-inflammatory prostaglandin PGE2 in CSF from ALS patients. *Neurology.* 58:1277-1279, 2002
3. Klivenyi P, Kiaei M, Gardian G, Calingasan NY, Beal MF. Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 88:576-582, 2004
4. Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem.* 282:11613-11617, 2007
5. Hasegawa H, Negishi M, Ichikawa A. Two isoforms of the prostaglandin E receptor EP3 subtype different in agonist-independent constitutive activity. *J Biol Chem.* 271:1857-1860, 1996
6. Irie A, Sugimoto Y, Namba T, Asano T, Ichikawa A, Negishi M. The C-terminus of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype is essential for activation of GTP-binding protein. *Eur J Biochem.* 224:161-166, 1994
7. Negishi M, Hasegawa H, Ichikawa A. Prostaglandin E receptor EP3g isoform, with mostly full constitutive Gi activity and agonist-dependent Gs activity. *FEBS Lett.* 386:165-168, 1996
8. Liang X, Wang Q, Shi J, Lokteva L, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K. The prostaglandin E2 EP2 receptor accelerates disease progression and inflammation in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 64:304-314, 2008;
9. Miyagishi H, Kosuge Y, Yoneoka Y, Ozone M, Endo M, Osada N, Ishige K, Kusama-Eguchi K, Ito Y. Prostaglandin E2-induced cell death is mediated by activation of EP2 receptors in motor neuron-like NSC-34 cells. *J Pharmacol Sci.* 121:347-350, 2013