

氏名	ひろせ みかこ 廣瀬 美嘉子
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	2021年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ALSモデルマウスにおけるアクアポリン4を介する老廃物排泄機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 三澤 日出巳 (博士(薬学)) (副査) 教授 有田 誠 (博士(薬学)) 教授 登美 斉俊 (博士(薬学))

## 論文内容の要旨

### 【背景】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、進行性の神経変性疾患であり上位及び下位運動神経が選択的に死滅していく。四肢の麻痺に始まり、やがて呼吸筋が麻痺し、死に至る。我が国における承認薬は、リルゾールとラジカットのみで治療効果は限定的であり、根本的な治療薬は存在しない。患者のうち9割は孤発性、1割は家族性で、家族性のうち2割でスーパーオキシドジスムターゼ1 (SOD1) の変異が検出される。変異ヒト SOD1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、四肢の筋萎縮やそれに伴う体重減少など、ALS の病態をよく再現し、ALS のモデルマウスとして広く使用されている。我々が用いた SOD1<sup>G93A</sup> マウスは ALS モデルマウスの中でも比較的発症が早いことから、特に広く用いられているモデルである。

SOD1 は通常、2量体を形成する抗酸化酵素で、活性酸素の一種、スーパーオキシドアニオンを酸素と過酸化水素に不均化する。SOD1 欠損マウスでは ALS 様症状を発症しないことから、酵素活性とは無関係に、変異した SOD1 が運動神経に対する何らかの毒性を獲得すると考えられている。野性型 SOD1 は 2 量体を形成し、亜鉛と銅を配位することで、極めて安定な構造を取っている。一方で我々は、変異 SOD1 で金属配位が外れると、体温 (37°C) 付近でその 2 量体の立体構造が変化するミスフォールディングが起りやすくなることを示している。このミスフォールディングが起こると、分子内のジスルフィド結合のシャッフルや、分子間でのジスルフィド結合が形成され、『SOD1 オリゴマー』と呼ばれる多量体構造を形成する。このミスフォールド SOD1 や SOD1 オリゴマーなどの異常構造タンパク質は運動神経細胞に蓄積し、神経細胞死を引き起こす毒性をもち、これが ALS 病態に関与すると考えられている。

一方で、中枢神経系からの老廃物排泄機構として、水チャネルのアクアポリン4 (AQP4) が中心的役割を担う『グリアリンパ系』という概念が近年提唱されている。これは、脳脊髄液 (CSF) が脳表面から動脈周囲腔 (Virchow-Robin space) を通って脳の実質内に流れ込み、組織間質液 (ISF) として静脈周囲腔に向かって一方向に流れる水流を形成する。脳実質内の老廃物はその一方向性の水流 (convective flow) に乗って脳外に洗い流されるという機構である。このとき、血管周囲腔-脳実質間の CSF 移動の

駆動力となっているのが AQP4 である。グリア細胞の一種、アストロサイトは脳血管を覆うように足突起を伸ばしており、その部分に AQP4 が集積している。この AQP4 の血管周囲への局在が ISF の動脈周囲腔から静脈周囲腔への一方向の流れを促し、不要タンパク質などの老廃物を効率よく排泄すると考えられている。先行研究において、アルツハイマー病モデルマウスの AQP4 を欠損すると、病態進行の加速と毒性タンパク質アミロイド  $\beta$  の蓄積亢進が報告されており、病態進行とグリアリンパ系との関与が示唆されている。我々の研究室での先行研究では、血管病の観点から ALS を研究し、BBB の構成要素であるアストロサイト足突起とそこに存在する AQP4 に着目してきた。これまでに、ALS マウスの AQP4 を欠損すると発症時期の早期化、生存期間の短縮、運動機能の低下という病態進行の加速・悪化が起こること、このモデルマウスの脊髄では病態進行に伴った AQP4 発現上昇・局在異常が見られることを示した。通常ではアストロサイトの足突起に局在して血管周囲への特異的集積が見られる AQP4 が、ALS の病態進行に伴ってアストロサイト足突起以外の部分、つまり、血管周囲以外の部分にも分布が広がっていた。また、遺伝性および孤発性 ALS 患者の剖検脊髄標本において AQP4 の発現上昇・局在異常が見られることを報告した。

#### 【目的】

本研究では、ALS の病態進行へのグリアリンパ系の関与について明らかにすることを目的として実験を行った。ALS モデルマウスにおいてグリアリンパ系の異常が検出されれば、ALS 新規治療薬の開発へ、グリアリンパ系の改善という新たな視点をもたらすことができると考えた。

#### 【実験方法】

マウス組織中に含まれる疾患特異的な異常構造タンパク質の定量はサンドウィッチ ELISA 法により行った。主病変部位（脊髄）からのタンパク質排泄能評価には、脊髄実質内にタンパク質溶液を微量投与する方法（脊髄内投与法）を用いた。投与後一定時間で、投与部位周辺の組織を採取し、ウエスタンブロッティング法により組織内の残存量を定量して排泄能の指標とした。ALS マウスにおけるグリアリンパ系の異常の有無については、脊髄内投与法および CSF 内に直接蛍光標識トレーサータンパク質溶液を投与する方法（大槽内投与法）の 2 つの方法により判定した。トレーサータンパク質として、外来タンパク質で SOD1 オリゴマーに分子量に近い ovalbumin (OVA) を用いた。蛍光標識した OVA を投与し、そのシグナルを観察、定量化する実験においては、OVA 投与後一定時間で 4% PFA にて灌流固定し、凍結組織切片を作製して解析に用いた。免疫組織染色は、free-float 切片の蛍光免疫染色法により行った。脊髄の血管周囲マクロファージ (perivascular macrophage: PVM) を枯渇させる目的で、クロドロン酸リポソームを大槽内に投与した。コントロール群には、中身が空のコントロールリポソームを投与した。PVM 枯渇によるタンパク質排泄能への影響は、外来タンパク質 OVA の蛍光標識体を脊髄内に投与し、投与部位周辺の連続切片の蛍光輝度値を測定することにより評価した。

## 【結果】

### 1. ALS マウスの病態進行におけるグリアリンパ系の関与

SOD1<sup>G93A</sup> マウスの主病変部位（脊髄）では、疾患特異的異常タンパク質であるミスフォールド型 SOD1 および SOD1 オリゴマーの病態進行に伴った蓄積増加が観察された。これらの異常タンパク質は、非病変部位の小脳では検出されなかった。この ALS マウスの AQP4 を欠損すると、病変部位における異常タンパク質の蓄積は病態期を問わず亢進した。一方で、マウス正常 SOD1 を含む総 SOD1 量は、病変部位、非病変部位を問わず検出されたが、病態進行による蓄積増加も、AQP4 欠損による蓄積亢進も見られなかった。次に、AQP4 欠損マウスを用いて、疾患特異的異常タンパク質である SOD1 オリゴマーがグリアリンパ系を介して排泄されるかを調べた。脊髄内に投与した微量の SOD1 オリゴマーは、投与後、時間経過に従って徐々に排泄され、その排泄能は AQP4 欠損により低下することがわかった。特に、SOD1 オリゴマー投与 3 時間後における差は顕著で、AQP4 欠損による排泄能は 61%低下した。先行研究において、ALS マウスで病態進行に伴った AQP4 の発現上昇・局在異常が示されていることから、次に、ALS マウスにおけるグリアリンパ系の状態を調べた。蛍光標識した外来タンパク質 OVA を大槽内投与法により CSF 中に投与し、脊髄への流入・脊髄からの流出を観察することにより、グリアリンパ系の状態を調べた。ALS マウスでは脊髄内 OVA 存在量の増加が認められた。大槽内投与後数時間ごとの脊髄内 OVA 存在量を経時的に測定したところ、両群で同一投与量であるにもかかわらず、WT マウスに比べて ALS マウスでは、投与後 0.5 時間から 16 時間の間に脊髄内に存在する OVA の総量(AUC)が多くなっていることがわかった。さらに、OVA を脊髄内投与し、外来タンパク質の脊髄からの排泄能を調べたところ、投与 3 時間後の時点で、ALS マウスでは WT マウスと比べて OVA の排泄が有意に遅延していることが示された。

### 2. グリアリンパ系による排泄系と血管周囲マクロファージによる排泄系との関係

大槽内投与法により、WT マウスと ALS マウスのグリアリンパ系の比較をした際に得られたデータの中で、投与後 4 時間、8 時間までは ALS マウス脊髄の OVA 残存量が有意に多かったにもかかわらず、16 時間では両群で差がなかった。この 16 時間時点での脊髄を観察すると、WT マウスと ALS マウスで大きな違いが見られた。外来タンパク質として投与した蛍光標識 OVA が何らかの細胞に取り込まれていることを示す組織像が観察されたが、その像の数が WT に比べ、ALS マウスで増加していた。そこで、外来タンパク質 OVA の排泄の過程に、グリアリンパ系以外の経路が関与してくる可能性を考えた。OVA を取り込んでいる細胞種を免疫組織染色により詳細に検討したところ、PVM であることが判明した。また、WT に比べて ALS マウスでは PVM に取り込まれている OVA の像が増加していることがわかった。最後に、PVM とグリアリンパ系との関係性を調べるため、PVM 枯渇によるタンパク質排泄能の変化を調べた。PVM による OVA 取り込みは、大槽内投与法においても脊髄内投与法においても、比較的長時間経過してから観察される現象であったため、OVA 投与後 3 時間と 6 時間の時間経

過でタンパク質排泄能を検討した。外来タンパク質 OVA を脊髄内投与したとき、3 時間後では排泄能に違いが見られなかったが、6 時間後では、枯渇群と非枯渇群で OVA の排泄能に違いが見られ、PVM 枯渇により排泄能が低下することがわかった。

## 【考察】

### 1. AQP4 欠損による ALS 病態への影響

神経変性疾患におけるグリアリンパ系の関与については今まで主にアルツハイマー病において盛んに研究されてきたが、今回、ALS モデルマウスにおいてもその病態進行にグリアリンパ系が関与していることが示された。

先行研究において、SOD1<sup>G93A</sup> マウスで AQP4 を欠損させると発症・生存期間の短縮、運動機能の悪化が観察されている。そのため、本研究ではまず、疾患特異的異常タンパク質であるミスフォールド SOD1 と SOD1 オリゴマーの蓄積を調べた。これらの異常タンパク質は病変部位において、病態進行に伴った蓄積量の増加が起きていることと、AQP4 を欠損した場合に蓄積の亢進が起こることを示した。この時、マウス由来の正常 SOD1 を含む総 SOD1 の量は、日齢、病変・非病変、AQP4 の有無に関わらず、ほぼ同程度であったことから、総 SOD1 量には影響せず、疾患特異的な異常タンパク質のみに変動が見られたことがわかる。この結果から、ALS における疾患特異的異常タンパク質の排泄に AQP4 の働きを介する老廃物排泄機構である、グリアリンパ系が関与していることが示唆された。

### 2. 疾患特異的異常タンパク質の脊髄からの排泄

次に、疾患特異的異常タンパク質の SOD1 オリゴマーがグリアリンパ系による排泄を受けているか、より直接的に検証した。ALS の主要病変部位は脳ではなく脊髄であることから、今回、腰髄実質内へのタンパク質溶液の投与を行った。CSF の産生部位の脳室から腰髄は距離的に遠く、グリアリンパ系による排泄能力も脳と同等とは限らない。そのため、初めに、腰髄において SOD1 オリゴマーの排泄が起こりうるかを確認した。腰髄実質内に SOD1 オリゴマーを投与しその減衰を定量的に確認したところ、WT マウスでは、6 時間までの間に経時的に残存量の減少が見られ、6 時間後には投与直後の 24% にまで減少した。AQP4 欠損マウスにおける SOD1 オリゴマーの排泄能を WT マウスと比較すると、投与 3 時間後の排泄能は約 61% に低下していた。この結果から、この ALS モデルマウスの疾患特異的異常タンパク質の排泄において、グリアリンパ系は主要な排泄経路であることがわかった。

さらに、蛍光標識 SOD1 オリゴマーを用いて、疾患特異的異常タンパク質の排泄過程を定性的に解析したところ、AQP4 欠損により、SOD1 オリゴマーの脊髄内での空間的な広がりが小さくなることが示された。これにより、脊髄実質内での拡散スピードの違いも、疾患特異的異常タンパク質の脊髄からのクリアランスに寄与していることが示唆された。AQP4 欠損マウスでは、血管周囲に AQP4 が存在しないため、脳の血管周囲腔から実質内に CSF が流入する段階で、その流入量が制限される<sup>13)</sup>ことが示されており、脳実質内を流れる ISF の流れが WT マウスに比べて弱くなると考えられる。こ

の弱まった流れが今回の結果を反映し、結果として、実質内からの SOD1 オリゴマーの排泄遅延にも寄与しているのではないかと考えている。

### 3. ALS マウスにおけるグリアリンパ系異常とヒトへの応用

疾患特異的異常タンパク質 SOD1 オリゴマーの排泄にグリアリンパ系が関与していることが示されたことから、次に、ALS マウスのグリアリンパ系について調べた。先行研究において、ALS マウスでは病態進行に伴った AQP4 の発現上昇・局在異常が観察されており、この AQP4 の発現変化が ALS マウスのグリアリンパ系にどう影響しているかを調べた。分子量が SOD1 オリゴマーと同程度で、疾患に無関係の外来タンパク質、OVA の大槽内投与実験により、WT マウスと ALS マウスそれぞれにおける、CSF から脊髄への OVA 取り込み・排泄の AUC 値を算出した。この値は、脊髄が 0.5 時間から 16 時間の間にどのくらいの量の OVA に暴露されたかを示す値である。この結果は、ALS マウスでは WT マウスに比べて、脊髄に一旦流入した外来タンパク質 OVA が脊髄内により長時間残留することを反映する結果であると考えた。これをさらに検証するため、脊髄内に直接 OVA を投与し、ALS マウスにおけるその排泄段階のみに焦点を当てた実験をすると、ALS マウスで OVA の排泄遅延が示された。つまり、ALS マウスでは、一旦脊髄内にタンパク質が入ったり、脊髄内でタンパク質が作られたりすると、脊髄実質内にそれが長時間溜まりやすくなり、その結果として、脊髄外に排泄する能力が低下する可能性が考えられた。

これらの結果をまとめると、WT、AQP4 欠損、ALS マウスでのグリアリンパ系による老廃物排泄能力の違いは以下のように考えられる。WT マウスでは、AQP4 はアストロサイトの endfeet に限局（血管周囲に局在）しており、血管周囲腔から十分な量の CSF が実質内に流入し、ISF の流れは大きく、動脈周囲から静脈周囲に一方向に流れ（convective flow）るため、実質内の老廃物の排泄が効率よく行われる。一方、AQP4 欠損マウスでは、血管周囲の AQP4 が存在しないため、血管周囲腔からの CSF の流入量の減少により、ISF の流れが弱まる。その影響で、実質内からの老廃物の排泄は、WT マウスに比べると遅延する。さらに ALS マウスにおいては、AQP4 の発現上昇・局在異常の影響により、AQP4 欠損時とはまた異なるグリアリンパ系の異常が起こっていると考えられる。ALS マウスにおいては、AQP4 の分布が、アストロサイトの endfeet に限らず、細胞体など、より広い分布となり、血管周囲に限った局在が観察できなくなっている。また、AQP4 はニューロピルに存在する、グリオーシスを起こしたアストロサイトでも強く発現することが観察されている。一方で、血管周囲の AQP4 発現は WT マウスと同様に維持されているため、血管周囲腔から十分な量の CSF が実質内に流入するという点では WT と変わらないと考える。しかし、脊髄実質内において、WT では分布しない部位に多くの AQP4 の分布が確認されることから、この異常分布が、ALS マウスにおけるグリアリンパ系の異常を引き起こしていると考えている。水輸送能をもつ

た AQP4 がランダムに分布することで、脊髄内での ISF の流れもランダムな流れとなり、WT マウスで形成できている convective flow が形成できなくなっていると考えられる。ISF の流れが乱れることで、SOD1 オリゴマーや OVA のようにグリアリンパ流に乗って排泄されるタンパク質は、脊髄内に長時間留まるような挙動を示し、排泄の遅延に繋がっていると考えられる。

また、脊髄内投与法により外から投与されたタンパク質は、投与開始と同時にまず、グリアリンパ系の ISF の流れに乗って排泄が開始され、その後、数時間経過すると（今回の実験で言えるのは 6 時間以降）、PVM による取り込みを介した排泄も開始されることがわかった。グリアリンパ系と PVM による貪食・処理機構は、脳内不要タンパク質排泄に関して協調して働いていることが示唆された。

### 【結論】

ALS モデルマウスにおいて、アクアポリン 4 を介する老廃物排泄機構（＝グリアリンパ系）の異常が示された。この異常は、現在までに報告されてきた AQP4 欠損マウスで観察されるグリアリンパ系の異常とは、別の機序であることが判明した。また、ALS マウスにおけるタンパク質排泄能異常を解析する中で、グリアリンパ系によるタンパク質排泄と PVM によるタンパク質排泄は中枢神経系において協働して老廃物を排泄していることが示唆され、グリアリンパ系を含むタンパク質排泄機構・タンパク質動態について、新しい知見が得られた。

## 論文審査結果の要旨

脳にはリンパ系が存在しないことが定説とされ、脳以外でみられるリンパ系による老廃物や代謝物の効率的排泄が、脳ではどのようなメカニズムで達成されているかは不明である。近年、脳での老廃物・代謝物の排泄機構としてグリアリンパ系（Glymphatic System）という概念が提唱されている。グリアリンパ系は、水チャネルのアクアポリン 4（AQP4）の水輸送能により、脳脊髄液（CSF）と脳実質内を流れる組織間質液（ISF）が脳の実質内の老廃物・代謝物を、水の流れの力で脳外に洗い流すという排泄機構である。この機構において最も重要な因子は AQP4 であり、AQP4 がグリアリンパ系の駆動力となる脳内水流を作ることが示されている。AQP4 欠損マウスを用いた検討により、CSF の脳実質内への流入と、実質内に投与した物質の脳外への排泄がどちらも約 60%低下することが示されている。グリアリンパ系の活性化因子として睡眠、運動など、その抑制因子として加齢や飲酒などが挙げられている。これらは多くの神経疾患の病態修飾因子として知られ、実際に、AQP4 欠損マウスでは疾患特異的タンパク質（アミロイドベータ）の排出遅延が報告され、アルツハイマー病におけるグリアリンパ系の異常が示唆されている。

申請者は ALS のモデル動物として SOD1<sup>G93A</sup> マウスを用い、ALS 病態におけるグリアリンパ系の変化について解析した。SOD1<sup>G93A</sup> マウスと AQP4 欠損マウスを掛け合わせ

ると、病態進行の加速とともに病態特異的タンパク質（SOD1 オリゴマー）の蓄積の増加も観察された。次に、AQP4 欠損マウスとコントロールマウスにおけるグリアリンパ系の活性を、標識 SOD1 オリゴマーを脊髄実質内に微量注入する方法で比較したところ、AQP4 欠損マウスで顕著な排泄遅延が観察された。次に、標識タンパク質を SOD1<sup>G93A</sup> マウスとコントロールマウスの CSF（大槽内）および脊髄実質内に投与して排泄動態パラメーターを定量化したところ、SOD1<sup>G93A</sup> マウスで顕著な排泄遅延が観察された。以上から、SOD1<sup>G93A</sup> マウスにおけるグリアリンパ系の異常が観察されたが、その異常は AQP4 欠損マウスで観察されるものとはメカニズムが異なることが示された。すなわち、SOD1<sup>G93A</sup> マウスでは AQP4 発現上昇と局在異常により、一方向性の ISF の流れ（convictional flow）が攪乱されることが、グリアリンパ系の異常となるという新たなメカニズムを提唱するに至った。さらに、このグリアリンパ系の異常と連動して、脊髄において血管周囲マクロファージの集積亢進がみられ、脳からの排泄物処理に一定の関与をするデータを示した。申請者の実験結果と考察は、ALS 病態に新たな視点を提供し、今後の治療法開発においても重要な基盤を提供するものであると高く評価された。

審査会において、グリアリンパ系と血液脳関門とは関連しているのか、グリアリンパ系へミクログリアは関与するのか、血管周囲マクロファージが異物処理をする際に炎症反応は惹起されるのか、他の神経変性疾患モデル動物でのグリアリンパ系の異常は報告されているのか、などの質問があったが、応答は概ね妥当であった。

以上より、申請者は博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

Mikako Hirose, Mito Asano, Saori Watanabe-Matsumoto, Koji Yamanaka, Yoichiro Abe, Masato Yasui, Eiichi Tokuda, Yoshiaki Furukawa, Hidemi Misawa.

Stagnation of glymphatic interstitial fluid flow and delay in waste clearance in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *Neuroscience Research*, 2020 (in press).

DOI : 10.1016/j.neures.2020.10.006.