

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	廣瀬 美嘉子
<p>主論文題名： 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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【背景】筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、進行性に上位及び下位運動神経が選択的に死滅していく神経変性疾患である。致死的な疾患であり、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、ALS の病態をよく再現し、ALS のモデルマウスとして広く用いられている。本研究においても SOD1^{G93A} マウスを使用した。このマウスでは、主病変部位 (脊髄) で病態進行に伴って、疾患特異的な異常構造タンパク質であるミスフォールド型 SOD1 と SOD1 オリゴマーが蓄積することがわかっている。一方で、中枢神経系からの老廃物排泄機構として、水チャネルであるアクアポリン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。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β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。我々は先行研究で血管病の観点から 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。その中で、SOD1^{G93A} 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、</p>			

血管周囲以外の部分にも分布が広がっていた。さらに、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てきた。

【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。投与後一定時間の、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、脊髄内投与法と、CSF 内に直接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には、外来タンパク質で、SOD1 オリゴマーに分子量が近い、ovalbumin (OVA) を用いた。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。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 の脊髄内投与法により評価した。

【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

ALS マウスにおいて AQP4 を欠損すると、主病変部位（脊髄）において、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 オリゴマーの蓄積亢進が観察された。次に、AQP4 欠損マウスを用いて、疾患特異的異常タンパク質の 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。これらの結果から、ALS 病態と SOD1 オリゴマーの排泄にグリアリンパ系が関与することが示された。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。その結果、WT マウスに比べて ALS マウスではグリアリンパ系が異常になっており、外来タンパク質 OVA の脊髄内での蓄積が起りやすくなっていることがわかった。また、OVA を脊髄内投与し、その排泄能を評価すると、WT マウスに比べ、ALS マウスでは排泄遅延が起こることがわかった。

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、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、ALS マウスではPVMに取り込まれている OVA 像の数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。外来タンパク質 OVA を脊髄内投与し、3 時間後では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】ALS マウスでは、過剰量になった AQP4 が、本来局在している血管周囲部（アストロサイト足突起）だけでなく、血管周囲以外の部分（アストロサイト細胞体など）にまで広く存在し、異所性に分布した AQP4 による水輸送がランダムに起こることで、ISF の一方向性の流れを形成できなくなっているのではないかと考えた。ISF の乱れた流れによって、SOD1 オリゴマーなどの異常タンパク質が脊髄実質内に通常より長く留まることで蓄積が亢進し、脊髄運動神経毒性を介する病態進行を加速している可能性がある。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）が異常になっていることが示された。この異常は、現在までに報告されてきた、AQP4 欠損マウスにおけ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。