

筋萎縮性側索硬化症の病態形成を担う新規脳領域の同定

国立精神・神経医療研究センター神経研究所神経薬理研究部

村松 里衣子

筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) の致死性の指定難病である。上位・下位運動ニューロンの変性を主徴とし、承認された治療薬は複数あるものの治療効果は極めて限定的で、最も医療ニーズが高い疾患と知られる。ALSは、発症してから数年以内に介護や人工呼吸器の装着が必要となるが、早期治療介入により症状の進行を遅らせることができるため、早期の診断手法や治療介入法の開発が、患者、寄り添う家族、医療従事者から切望されている。

ALS患者には孤発例が多いが、一部の家族性ALSに関しては、その原因遺伝子異常の同定および機能解析が進められている。機能解析において、ALSでも内因性と外因性のメカニズムが探索されており、内因性としては変性する神経細胞における原因遺伝子の働きが、外因性としては変性する神経細胞とその近傍の細胞（グリア細胞など）あるいは神経線維の走行領域との相互作用に着目した3つの着眼点で研究が進められている。前者の2つ、内因性および近傍の細胞との相互作用については、上位および下位運動ニューロンを対象とした検討が進められているが、3つ目の神経突起の走行領域が変性する神経に与える作用については、下位運動ニューロンの神経筋接合部における検討がなされる一方、上位運動ニューロンを対象とした検討はほぼない。

上位運動ニューロン病で変性する神経回路として知られる皮質脊髄路は、大脳皮質に細胞体を配置し、脊髄へ軸索を投射する下行性の運動神経回路である。皮質脊髄路の走行に関して、近年の神経投射の検出技術法の進展により、脳領域との新たな連絡が最近も見いだされており、その一つに線条体がある (Nelson et al, *Nat Neurosci*, 2021)。従来、ALSにおいて脳内での変性の広がり、運動野を起点とすると考えられていたが、ALSのモデルマウスにおいて症状発症前から線条体での形態変化 (スパイン数の低下) が認められること (Fogarty et al, *Front Neurosci*, 2007)、また運動野の障害が顕著ではないALS患者でも線条体で旺盛な封入体形成が検出されること (Zhang et al, *Acta Neuropathol*, 2008) から、ALSでは運動野の変性に先立ち他の脳領域、特に線条体の変化が生じ、線条体の異常を逆行性に運動野へ伝達することで、神経変性を誘導するという仮説に至った。

本研究ではまず、ALSモデルマウスにおける脳内の遺伝子発現変化を検出するため、症状発症前後の空間的トランスクリプトミクス解析 (Visium) を実施した (図1)。神経細胞でTDP43を高発現するマウスを用いて検出された遺伝子のクラスタリングを行い、UMAPを描いたところ、大脳皮質、中核野、線条体の3つに大別された。続いて、コントロールとALS発症前、発症後と比較したところ、発症前後のいずれも、特に線条体で遺伝子発現の変動が認めら

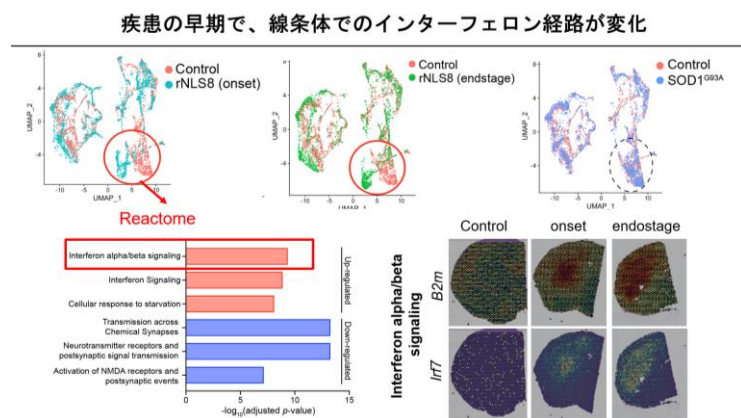


図1. ALSモデルマウスにおける発症前の遺伝子発現変化の検討。線条体でのクラスターで顕著な遺伝子発現の変動を見出した (上段、赤丸内)。

れた。そこで、線条体での遺伝子発現に対してパスウェイ解析を行ったところ、特にタイプ I インターフェロン経路にアノテーションされる遺伝子の発現が有意に上昇する結果であった。実際にインターフェロン経路に分類される遺伝子としてB2MやIfr7の発現を検出したところ、コントロールと比較し発現量の増加が認められた。

インターフェロン経路の活性化は神経系ではシナプス形成を阻害する作用が知られる。そこで、ALSの発症前に認められる線条体でのシナプス関連分子の発現も変動するか、visiumの結果を参照した(図2)。すると、シナプス関連遺伝子の発現もALS症状の発症前後ではコントロールと比較し変動していた。また線条体でのスパイン数をゴルジ染色により検討したところ、コントロールと比較しALSモデルマウスでは少なかった。また、ALSモデルマウスではコントロールと比較し線条体でのc-fos陽性細胞は少ない様子も検出された。これらのことから、ALSモデルマウスでは症状があらわれる以前に、線条体と運動野の接続性が低下していることが示唆された。

続いて、ALSモデルマウスでインターフェロンシグナルが活性化する機序について検討した。高発現したTDP43がインターフェロンシグナルを活性化させるためには、IFNARが活性化する必要がある。そこでTDP43が直接IFNARに作用するか検証し、ELISAで直接結合する可能性を見出した。そこでin vivoでもTDP43がIFNARに結合するか検討するため、ALSモデルマウスの線条体組織を用いた、IFNAR1抗体で免疫沈降を実施した。するとALSモデルマウスにおいてのみ、IFNAR抗体に反応した分画でTDP43抗体によるバンドが検出されたことから、ALSモデルマウス線条体においても、IFNARとTDP43が直接結合することが示唆された。

次に、インターフェロンシグナルがALSモデルマウスにおける症状の発症や進展に関わるか検討した(図3)。ALSモデルマウスの線条体にINFAR機能阻害抗体を持続的に投与し、症状の推移を検討した。すると、INFAR機能阻害抗体投与群では、発症日が遅延した。rotarod testにより運動機能を評価したところ、INFAR機能阻害抗体では運動機能の低下が阻害された。線条体におけるスパインの形態学的な解析を実施したところ、INFAR機能阻害抗体投与群ではコントロールと比較しスパイン数が多かった。これらの結果から、線条体でのインターフェロンシグナルの抑制により、組織学的な神経変性とそれに伴う運動機能の低下が抑制されることが示唆された。

線条体には多種類の細胞が含まれるため、ALSにおけるインターフェロンシグナルの活性化を担う細胞の同定を試みた(図4)。シングルセル解析を行ったところ、12のクラスターに分類することができたが、いずれにおいても、ALSモデルマウスとコントロールとの間にクラスターの大きさに関しては顕著な差はなかった。一方、各クラスターに含まれる変動遺伝子に関して

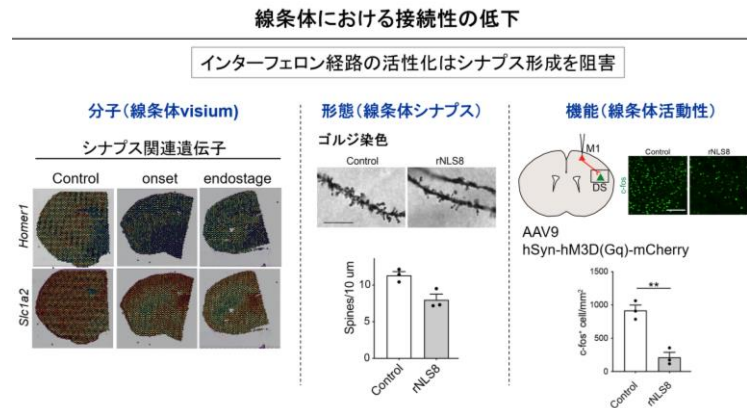


図2. ALSモデルマウスの発症前での線条体での分子・形態・機能的変化。シナプス関連遺伝子の発現はALSの発症前から線条体で顕著に変動する様子を検出した。

線条体でのIFNシグナル抑制により症状の発症が遅延

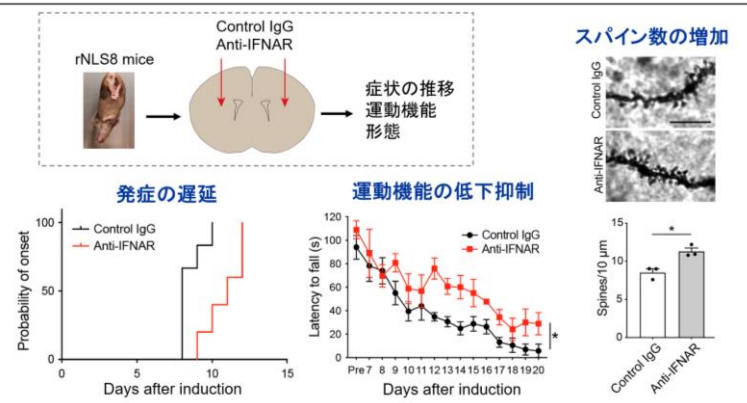


図3. インターフェロンシグナルの抑制による症状発症の抑制効果。IFNAR機能阻害抗体を線条体に投与すると、発症の遅延や運動機能低下が抑制され、症状の進行を阻む作用を有する結果であった。

は、アストロサイトにおいて顕著な遺伝子発現の増減を検出した。変動遺伝子に対するパスウェイ解析を実施すると、シナプスにアノテーションされる遺伝子が有意に変動しており、実際に複数のシナプス関連遺伝子の発現変動が検出された。中にはインターフェロンシグナルに関連するものも含まれた。この結果から、線条体のアストロサイトでのインターフェロンシグナルの変動が、シナプス関連遺伝子の発現を変動させると考察した。

最後に、患者検体を用いた解析を実施した。ALSと診断された患者由来の凍結脳サンプル

と対照群を用いて、シングル核解析を実施したところ（図5）、19のクラスターに分類された。アストロサイトにおいても2つのクラスターが検出され、いずれにおいてもクラスターの大きさに顕著な変動は認められなかったが、両クラスターとも有意に発現増減する遺伝子が検出された。また、シナプス関連にアノテーションされる遺伝子の発現はALS患者と

対照群の間に差が認められた。以上のことから、マウスで検出したALSの線条体でのアストロサイトのシナプス形成への作用は、ヒトALSにおいても保存される現象である可能性が示唆された。

本研究では、ALSの発症以前に線条体で機能変化が生じていること、またその結果として上位運動ニューロンの変性が誘導される新しい作用点が存在する可能性を示唆した。線条体での機能変化を検出する手法が開発されれば早期診断に貢献し、線条体の機能変化による運動ニューロンへの変性誘導効果を抑制することができれば、ALSの症状の進行を妨げる治療につながると期待される。本研究では、神経変性の機序の一端としてインターフェロンシグナルの関与を示唆したが、線条体のアストロサイトのインターフェロンシグナルのALS発症に対する寄与度については不明である。また、一般的にアストロサイトには神経保護効果もあり、同一細胞内でも多様性がある。今後、線条体のアストロサイトによる毒性獲得機構を精査することが、より選択的な神経変性誘導機構の阻害手法を開発するために重要と考える。

線条体のアストロサイト異常が関与

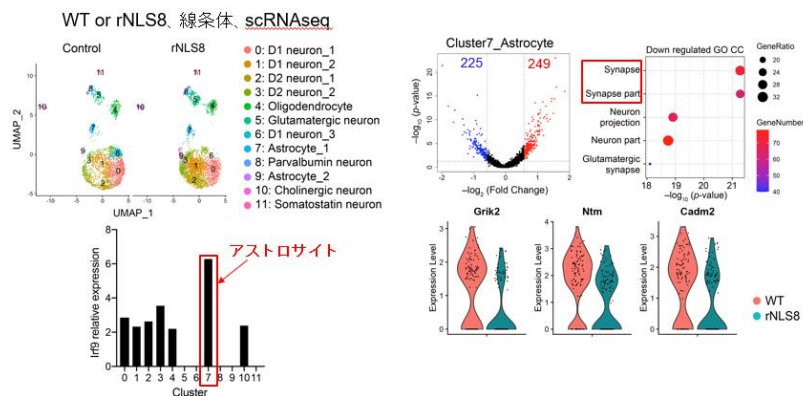


図4. ALSモデルマウスにおける発症前での線条体遺伝子発現の変化。シングルセル解析によりクラスターの大きな変動はないものの、アストロサイトのクラスターで顕著な遺伝子発現の変動が検出された。

ALS患者脳でもアストロサイトでシナプス関連遺伝子発現が変化

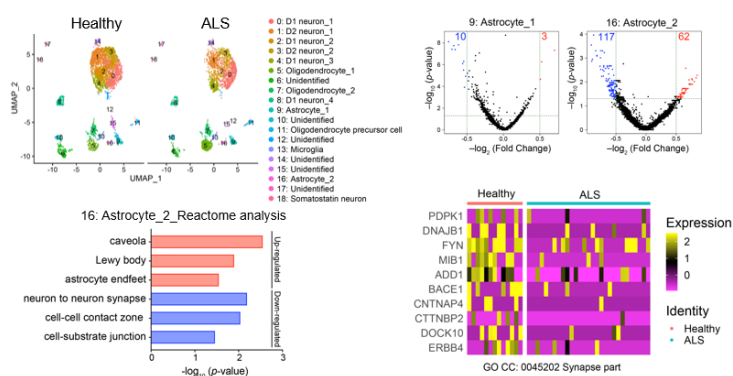


図5. ALS患者脳におけるシングル核解析の結果。アストロサイトのクラスター2種において、対象群と比較し顕著な遺伝子発現の変動が認められ（右上）、シナプス関連遺伝子の変動も検出された（右下）。