

平成 30 年 4 月 6 日

## 自然免疫分子 TRIF が難病 ALS の神経保護の鍵となる ～異常グリア細胞を取り除く新規治療法の開発に期待～

名古屋大学環境医学研究所（所長：山中 宏二）（医学系研究科（研究科長：門松 健治）協力講座）の小峯 起（こみね おきる）助教、山中 宏二（やまなか こうじ）教授らの研究グループは、神経難病 ALS（筋萎縮性側索硬化症）モデルマウス<sup>\*1</sup>を用いた研究により、自然免疫<sup>\*2</sup>分子 TRIF が、異常化したグリア細胞<sup>\*3</sup>を取り除き、神経保護機能を持つことを発見しました。

ALS は、大脳や脊髄の運動神経が死に至る原因不明の神経難病です。ALS モデルマウスを用いた研究により、運動神経細胞の異常以外に、その周囲で神経をサポートするグリア細胞の異常や、病巣に侵入した免疫細胞も病態に関与することが知られています。免疫反応は、先天性の自然免疫反応とリンパ球が関与する後天性の獲得免疫反応の 2 つに大別されますが、これまで、自然免疫反応の ALS 病態への関与は解明されていません。研究グループは、自然免疫反応の役割を明らかにするため、自然免疫反応のセンサーである Toll 様受容体<sup>\*4</sup>の機能の鍵となる分子の、MyD88 及び TRIF を欠損した ALS マウスを作成し、解析しました。その結果、TRIF を欠損した場合にのみ ALS マウスの生存期間が著しく短縮し、グリア細胞の一種であるアストロサイトが異常化して病巣に蓄積しました。TRIF が正常な場合、自己細胞死（アポトーシス）<sup>\*5</sup>により異常アストロサイトが除去されましたが、TRIF 欠損では、その除去が不十分で、運動神経周囲の環境を悪化させて、ALS の病態を悪化させることが判明しました。

本研究成果は、ALS における自然免疫反応の関与と、病巣で異常に活性化したグリア細胞を細胞死（アポトーシス）によって除去する TRIF の新たな機能を明らかにしたものであり、TRIF の機能を活性化することによる ALS の新たな治療法の開発につながることを期待されます。本研究成果は、平成 30 年 3 月 22 日（日本時間）に英国科学誌「Cell Death & Differentiation」電子版に掲載されました。

# 自然免疫分子 TRIF が難病 ALS の神経保護の鍵となる ～異常グリア細胞を取り除く新規治療法の開発に期待～

## ポイント

- 神経難病 ALS の病態において、運動神経細胞の異常以外にその周囲のグリア細胞や免疫細胞の関与が示唆されている。
- 自然免疫分子 TRIF の欠損により、ALS マウスの病態が悪化し、生存期間が短縮する。
- TRIF 欠損により異常なグリア細胞（アストロサイト）が病巣に蓄積し、運動神経周囲の環境を悪化させる。
- TRIF の機能を活性化して異常なグリア細胞を取り除く ALS の新規治療法の開発が期待される。

## 1. 背景

ALS は、大脳や脊髄に存在する運動神経細胞が変性、脱落し、全身の筋肉の麻痺をきたす原因不明の神経変性疾患です。ALS は中年以降に発症し、発症後 1～5 年以内に呼吸筋の麻痺のため、人工呼吸器なしには生存できなくなる重篤な神経疾患で、原因解明と治療法の開発が強く望まれています。日本では約 9000 人の ALS 患者が闘病しています。ALS の約 90%は遺伝歴がなく孤発性 ALS と呼ばれ、残りの約 10%は遺伝性により発症します。

ALS モデルマウスを用いた研究により、運動神経細胞の異常のみならず、その周囲のグリア細胞（ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイト）の異常も病態に関与することが明らかになっています。また、近年では、病巣に侵入した免疫細胞も ALS 病態に関与していることが報告されています。免疫反応は、病原体の感染などによって初動される先天性の自然免疫反応と、それに続いて誘導され、リンパ球が関与する後天性の獲得免疫反応の 2 つに大別されます。ALS におけるこれまでの研究報告は、リンパ球が関与する獲得免疫反応に関するものが多く、自然免疫反応の役割は、ほとんど知られていませんでした。

## 2. 研究成果

研究グループはまず、ALS 病態における自然免疫反応の役割を明らかにするため、自然免疫反応を感知する受容体として重要な Toll 様受容体 (TLR) の機能の鍵となる 2 つの分子である MyD88、TRIF が欠損したマウスと、ALS モデルマウスを交配することで、TLR を介した自然免疫が働かない ALS マウスを二種作製し、生存解析を行いました。その結果、TRIF を欠損した場合にのみ ALS マウスの生存期間が著しく短縮しました (図 1)。

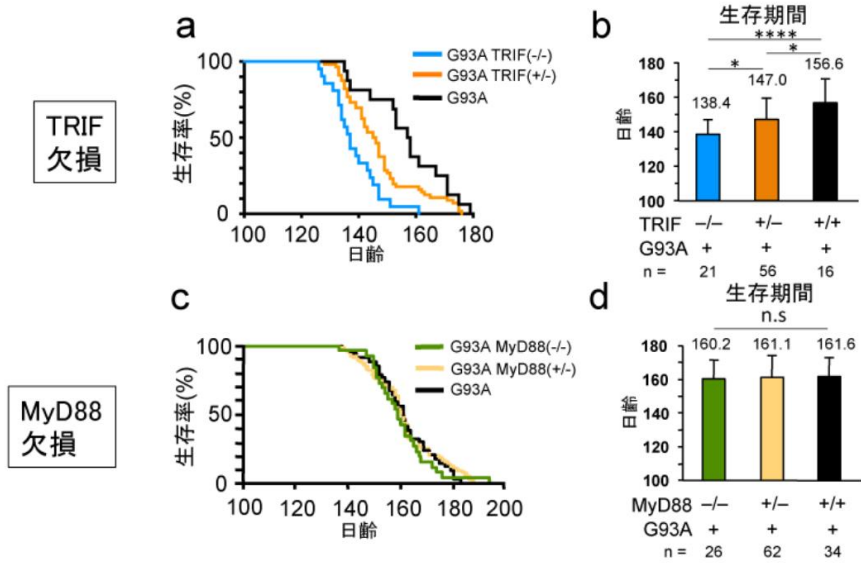


図1. TRIFを欠損した場合のみ生存期間の短縮が見られた。

TRIF を欠損した ALS マウスでは、(1) 特定の免疫細胞の脊髄病巣への侵入の減少、(2) グリア細胞の一種であるミクログリアの増加、(3) グリア細胞の一種のアストロサイトが異常化した異常アストロサイトの増加、がみられました (図2)。

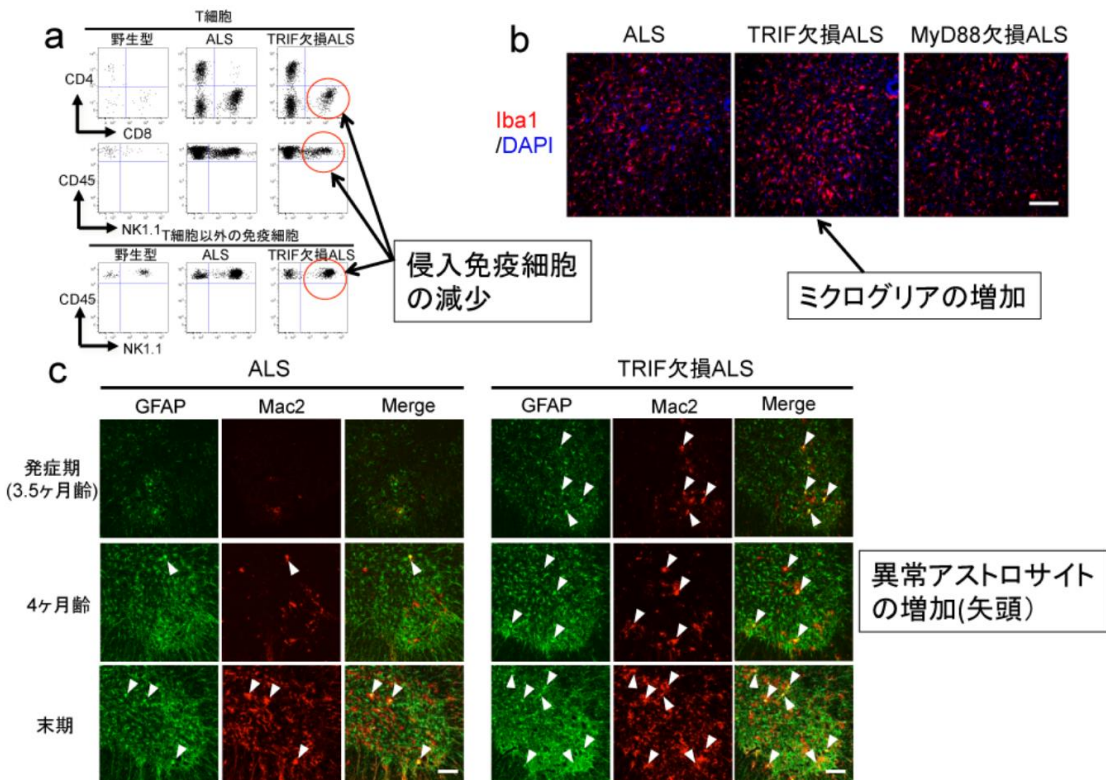


図2. TRIF欠損ALSモデルマウスにおいて、侵入免疫細胞の減少、ミクログリアの増加、異常アストロサイトの増加がみられた。

次に、(1) の脊髄に侵入した免疫細胞の病態への影響を検証するため、サイトカイン及び抗体の投与によって、特定の免疫細胞を増減させた ALS モデルマウスを作製し、生存解析を行いました。そ

の結果、脊髄に侵入する主な免疫細胞を増減させても生存期間は変化しませんでした（図3）。この結果から、脊髄に侵入するこれらの免疫細胞は、ALS マウスの病態や生存期間にさほど影響しないことが判明しました。

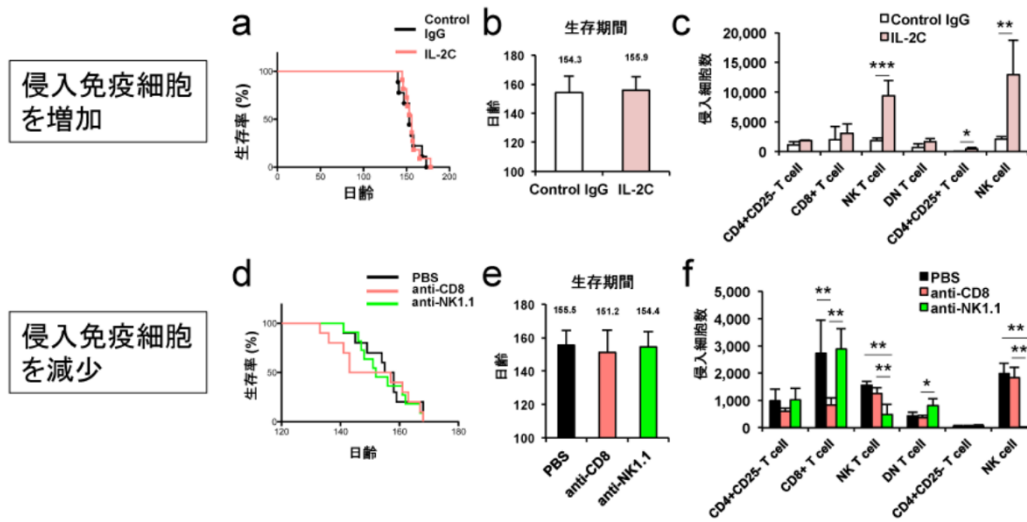


図3. 侵入免疫細胞を増減させたALSモデルマウスの生存期間に変化は見られなかった。

また、MyD88 と異なり、TRIF には、病原体に感染した細胞に自己細胞死（アポトーシス）を誘導することで、病原体の伝播を防ぐという自己防衛的な役割があることが報告されています。そこで、上述の（2）及び（3）に関連し、病巣での細胞数の増加の見られたグリア細胞のミクログリアとアストロサイトに注目して、それらのアポトーシスについて解析しました。その結果、TRIF が正常な場合、異常なアストロサイトの多くにアポトーシスが誘導されていましたが、TRIF の欠損によりそれが大きく減弱して、細胞死が起こりにくいことがわかりました（図4）。

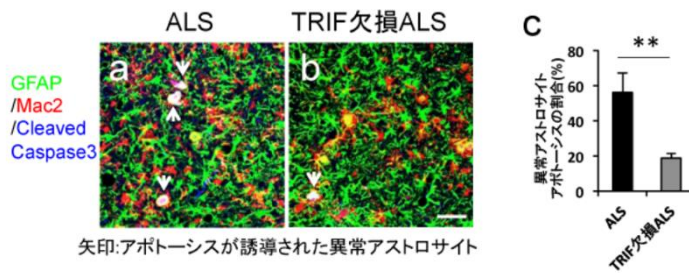


図4. TRIF欠損により異常アストロサイトのアポトーシスが減弱していた。

一方で、ミクログリアには、アポトーシスはほとんど誘導されていませんでした。最後に、TRIF 欠損による ALS マウスの生存期間短縮に関わる細胞を明らかにするため、ミクログリア及び異常アストロサイトの細胞数と生存期間の相関関係を調べたところ、異常アストロサイトの細胞数と生存期間に負の相関が見られることが判明しました（図5）。病巣に異常アストロサイトが多い個体ほど、その生存期間が短くなる、つまり、異常アストロサイトの存在は有害であることが示唆されま



した。

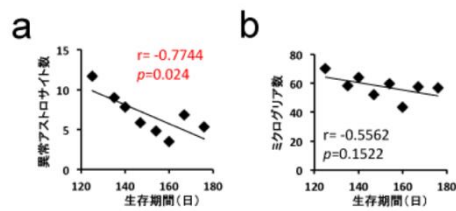


図5. 異常アストロサイト数と生存期間に負の相関がみられた。

正常では長い突起を持つアストロサイトと異なり、異常アストロサイトは、大型で丸い形態をして活性酸素を異常に放出する、異常に活性化したアストロサイトであり、運動神経に対して有害であると考えられます（図6）。

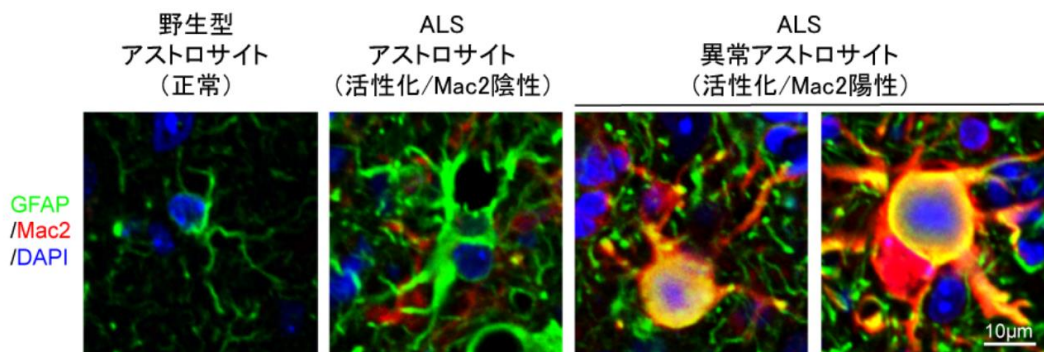


図6. 異常アストロサイトは、Mac2陽性であり、大型で丸い形態を示していた。

以上の結果から、ALSの病巣では、本来神経をサポートする働きを持つグリア細胞の一種、アストロサイトが異常化し、運動神経に有害な変化を起こすことが明らかとなりました。また自然免疫分子 TRIF の活性化は、運動神経にとって有害となった異常なアストロサイトの自己細胞死（アポトーシス）を促すことで、神経保護機能を果たしていることが示唆されました。本研究成果は、自然免疫分子 TRIF の機能を活性化することによって異常アストロサイトを取り除く新たな治療法の開発につながることを期待されます。

### 3. 今後の展開

ALSは、原因不明の神経難病であり、早急な病態解明と有効な治療法開発が望まれています。ALSモデル動物を用いた本研究により、生来備わっている自然免疫反応の重要な分子の一つである TRIF が、病原体の感染時のみならず、ALSの病態にも関与していることが初めて明らかになりました。また、運動神経に対して有害な異常化したアストロサイトが、TRIFの活性化によって自己防衛的に除去されていることが判明しました。本研究成果により、自然免疫分子 TRIF の活性化によって異常なアストロサイトを取り除く新たな治療法の開発につながることを期待されます。

### 4. 謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業（JST-CREST）、日本医療開発機構（AMED）、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団、日本ALS協会、堀科学芸

術振興財団より研究助成を受けて行われ、理化学研究所脳科学総合研究センター、京都大学、順天堂大学、慶応義塾大学、千葉大学、東京大学、大阪大学との共同研究による成果です。

## 5. 用語説明

### 1. ALS モデルマウス（ヒト変異 SOD1 発現マウス）：

ALS 変異を有するヒト SOD1（※）遺伝子を全身に過剰に産生するトランスジェニックマウスは、脊髄の運動神経に細胞死を引き起こすことにより筋麻痺を生じ、グリア細胞の活性化も含めて ALS の病態をよく再現するモデルとして ALS 研究に用いられている。本研究で用いた ALS モデルマウスは、93 番アミノ酸がグリシンからアラニンへ変異している遺伝子を発現する SOD1<sup>G93A</sup> マウスであり、その生存期間は約 5 ヶ月である。

### ※SOD1（Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ）：

SOD1 は 153 アミノ酸からなるタンパク質で、二量体を形成し、活性酸素種のスーパーオキシドを過酸化水素に変換する反応を触媒する酵素である。1993 年に優性遺伝性 ALS の原因遺伝子として初めて同定された。患者由来の SOD1 変異のほとんどは 1 アミノ酸置換をきたす点変異であるが、一部はタンパク質の一部を欠くフレームシフト変異の報告もある。ALS の発症には酵素活性の有無は関係なく、変異 SOD1 タンパク質が構造異常を引き起こし、神経毒性を獲得することにより神経変性に至ると考えられている。

### 2. 自然免疫と獲得免疫：

自然免疫は、下等生物から高等生物に共通して備わっている免疫機構で、病原体の侵入を感知して初動される。主に好中球やマクロファージ、樹状細胞といった食細胞が担当し、病原体特有の構成成分を認識する受容体（パターン認識受容体）を介して病原体を認識し、貪食、消化する。一方、獲得免疫は、感染源で病原体を貪食、消化した樹状細胞が、リンパ節等に移動し、T 細胞や B 細胞に抗原提示することによって誘導されるリンパ球を介した反応特異性の高い後天的に獲得される免疫機構である。獲得免疫は、自然免疫と異なり、病原体の再感染に迅速に反応し、より強力な免疫反応を発揮する（免疫記憶）。

### 3. グリア細胞：

ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを代表とした中枢神経内に存在する非神経細胞である。ミクログリアは、免疫細胞と似た役割をもち、組織損傷時などに活性化し、炎症性サイトカインや神経栄養因子を産生することで損傷神経の除去や組織修復に機能する。アストロサイトは、神経細胞の周囲に豊富に存在し、神経伝達物質の取り込みやエネルギー供給などを通して神経活動に機能するとともに神経栄養因子を産生して、神経細胞をサポートする。オリゴデンドロサイトは、ミエリン髄鞘を形成し、神経伝達速度を促進する機能が知られている。ALS 等の神経変性疾患の病巣においてグリア細胞の異常や活性化（神経炎症）が観察され、病態に関与することが報告されている。

### 4. Toll 様受容体（Toll-like receptor）：

ショウジョウバエの感染防御研究によって同定された Toll 遺伝子がきっかけとなり哺乳類で

同定された受容体である（それぞれの発見者であるホフマン博士とポイトラー博士は 2011 年にノーベル賞受賞）。ヒトでは 10 種類、マウスでは 13 種類のファミリーの存在が明らかになっている。病原体の感染に際し、病原体特有の糖脂質や核酸などを認識して活性化し、MyD88 もしくは TRIF の 2 種類のアダプター分子を介して感染防御反応を誘導する。

#### 5. 自己細胞死（アポトーシス）：

プログラム細胞死とも呼ばれ、発生過程で不要になった細胞や成体にとって害になる感染細胞やがん細胞に自己細胞死を誘導する細胞の死に方である。タンパク質の切断を行うプロテアーゼであるカスパーゼの活性化によって誘導され、核の濃縮や DNA 断片化などを伴う。

### 6. 発表雑誌

Okiru Komine<sup>1</sup>, Hirofumi Yamashita<sup>2, 3</sup>, Noriko Fujimori-Tonou<sup>2</sup>, Masato Koike<sup>4</sup>, Shijie Jin<sup>1</sup>, Yasuhiro Moriwaki<sup>5</sup>, Fumito Endo<sup>1</sup>, Seiji Watanabe<sup>1</sup>, Satoshi Uematsu<sup>6, 7</sup>, Shizuo Akira<sup>8</sup>, Yasuo Uchiyama<sup>4</sup>, Ryosuke Takahashi<sup>3</sup>, Hidemi Misawa<sup>5</sup>, Koji Yamanaka<sup>1,2,9</sup>

名古屋大学環境医学研究所<sup>1</sup>, 理化学研究所脳科学総合研究センター<sup>2</sup>, 京都大学大学院医学研究科<sup>3</sup>, 順天堂大学大学院医学研究科<sup>4</sup>, 慶応義塾大学薬学部<sup>5</sup>, 千葉大学医学部<sup>6</sup>, 東京大学医科学研究所<sup>7</sup>, 大阪大学免疫学フロンティア研究センターおよび微生物病研究所<sup>8</sup>, 名古屋大学医学系研究科<sup>9</sup>

Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes.

Cell Death & Differentiation (2018 年 3 月 22 日付の電子版)

DOI:10.1038/s41418-018-0098-3

#### English ver.

[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_E/research/pdf/Cell\\_D\\_20180406en.pdf](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Cell_D_20180406en.pdf)