

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスを用いた 感覚ニューロンの解析

吉川雅朗¹⁾, 松川 睦¹⁾, 大島秀規²⁾, 相澤 信¹⁾

Analysis of sensory neurons in ALS model mice

Masaaki YOSHIKAWA¹⁾, Mutsumi MATSUKAWA¹⁾, Hideki OSHIMA²⁾, Shin AIZAWA¹⁾

要旨

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンが選択的に障害される疾患であるが、近年の報告から感覚系の障害が示唆されている。そこで、本研究ではALSモデルマウスを用いて、感覚ニューロンの変化を調べた。発症後と発症前のALSモデルマウスから脊髄神経節 (DRG) を摘出し、RNAシーケンス解析を行った結果、神経損傷により発現が誘導されるATF3 (発症後) とVIP (発症前) の発現上昇が示された。また、固有感覚ニューロンマーカーであるparvalbumin (発症後) と侵害受容ニューロンマーカーであるMrgpra4, 6 (発症前) の発現が低下していた。以上から、ALSモデルマウスにおいて、運動ニューロンだけでなく感覚ニューロンも障害されており、感覚ニューロンのサブタイプにより障害のされ方が異なる可能性が示唆された。

1. 背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動ニューロンが徐々に変性していくために筋肉の萎縮と筋力の低下を引き起こす神経変性疾患であり、その原因はほとんど分かっていない (Vinsant et al., 2013a)。ALSでは感覚障害がみられることはまれであることから、病態の主軸から外れる感覚系は、研究対象として取り上げられることはほとんどなかった。しかし、近年一部の症例で感覚障害を伴うことや、疼痛を経験する患者が多数存在することが報告されている (Iglesias et al., 2015)。また、モデル動物の解析で感覚神経線維の異常や感覚ニューロンのミトコンドリアの異常があるとの報告もある (Guo et al., 2009)。ALSは運動ニューロンを選択的に障害する疾患であるが、上記のように感覚系も障害されていると考えられる。しかしながら、これまでのモデル動物の解析は、感覚ニューロンの一般的なマーカーを用いた大まかなものであり、ニューロン数が有意に減少していないことは確認できるものの、その内

訳が変化しているかは不明である。そこで、本研究ではALSモデルマウスを用いて、感覚ニューロンの変化を詳細に調べた。

2. 方法

ALSモデルマウスであるG93A変異*SOD1*遺伝子組換えマウス (*SOD1G93A* マウス) は、生後90日 (P90) 付近で発症し、P140までに死亡する。本研究では発症後 (P120) と発症前 (P30) の野生型および*SOD1G93A* マウスを実験に用いた。なお、本研究は日本大学動物実験委員会の承認を得て行った。

イソフルランによる深麻酔下で、下肢領域の皮膚や筋に分布する腰髄レベルの脊髄神経節 (DRG) を摘出し、RNAiso (タカラバイオ) に入れ凍結させた。RNAを抽出し、つくばi-Laboratory LLPにてRNAシーケンス (RNA-seq) を実施した (Morito et al., 2018)。その後、トランスクリプトーム解析を行った。

¹⁾ 日本大学医学部機能形態学系生体構造医学分野
²⁾ 日本大学医学部脳神経外科学系神経外科学分野
吉川雅朗: yoshikawa.masaaki@nihon-u.ac.jp

表1 ALS発症後のDRGで発現上昇または低下した代表的な遺伝子

シンボル	遺伝子名	発現変動率
発現上昇		
Gpnmb	glycoprotein (transmembrane) nmb	65.83
Atf3	activating transcription factor 3	10.52
Apod	apolipoprotein D	2.98
発現低下		
Pvalb	parvalbumin	-12.63
Mal	myelin and lymphocyte protein, T cell differentiation protein	-2.32
Pmp22	peripheral myelin protein 22	-2.11

表2 ALS発症前のDRGで発現上昇または低下した代表的な遺伝子

シンボル	遺伝子名	発現変動率
発現上昇		
Vip	Vasoactive intestinal peptide	81.11
Trpc7	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 7	10.52
Hspb7	heat shock protein family B, member 7	2.98
発現低下		
Mrgpra6	Mas-related G-protein coupled receptor, member A6	-19.03
Mrgpra4	Mas-related G-protein coupled receptor, member A4	-4.46
Esr2	estrogen receptor 2 (ER beta)	-2.46

3. 結果

RNA-seqの解析により、発症後（P120）と発症前（P30）のDRGにおける発現変動遺伝子を同定した。発症後のDRGにおいて、細胞死を抑制し神経保護作用のあるGpnmbと神経損傷によって発現が誘導されるATF3の発現が上昇し、固有感覚ニューロンマーカーであるparvalbuminと細胞死に関わるMal, Pmp22の発現が低下した（表1）。発症前のDRGにおいて、神経損傷によって発現が誘導され神経保護作用のあるVIPの発現が上昇し、侵害受容ニューロンマーカーであるMrgpra4, Mrgpra6, Esr2の発現が低下していた（表2）。

4. 考察

本研究ではRNA-seqを用いて、ALS発症後と発症前のDRGにおける遺伝子発現の変化を明らかにした。ALS発症後、固有感覚ニューロンのマーカーparvalbuminの発現が低下していた。脊髄運動ニューロン死が起こっていることから、それに伴い固有感覚の神経回路にも異常が起こっていると考

えられる。また、細胞死や神経保護に関する因子（Gpnmb, ATF3, Mal, Pmp22）の発現変動が見られることから、他の感覚ニューロンも障害が起こっていることが示唆される。発症前のP30では運動ニューロンのミトコンドリアに異常が見られ、一部の速筋で脱神経が起こっているが（Vinsant et al., 2013b）、感覚ニューロンの異常は報告されていない。ALSでは異常が見られないとされている皮膚感覚、とくに侵害受容に関わる因子（Mrgpra4, Mrgpra6, Esr2）に変化が見られた。これらの因子は侵害受容ニューロンのサブグループであるため、ごく一部の感覚に異常が起こると予想される。また、神経保護作用のあるVIPの発現が上昇していることから、感覚ニューロンが運動ニューロンに比べて障害を受けにくい理由のひとつであると示唆される。

5. 結語

次世代シーケンサーを用いて、ALSモデルマウスの感覚神経節のトランスクリプトーム解析を行った。RNA-seqによる遺伝子発現解析の結果から、感

覚系も変異SOD1の影響を受け、多数の遺伝子発現に変化が起こることが明らかになった。今後、本研究で得られた発現変動遺伝子を詳細に解析することで、障害のされ方が異なる感覚ニューロンの特性が明らかになれば、ALSの病態を理解する上で新たな方向性を提案できるものと考ええる。

文 献

- 1) Guo YS, Wu DX, Wu HR, Wu SY, Yang C, Li B, Bu H, Zhang YS, Li CY. (2009) Sensory involvement in the SOD1-G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Mol Med*. 41: 140 – 150.
- 2) Iglesias C, Sangari S, El Mendili MM, Benali H, Marchand-Pauvert V, Pradat PF. (2015) Electrophysiological and spinal imaging evidences for sensory dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *BMJ Open*. 5: e007659.
- 3) Morito N, Yoh K, Usui T, Oishi H, Ojima M, Fujita A, Koshida R, Shawki HH, Hamada M, Muratani M, Yamagata K, Takahashi S. (2018) Transcription factor MafB may play an important role in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 93: 54 – 68.
- 4) Sábado J, Casanovas A, Tarabal O, Hereu M, Piedrafita L, Calderó J, Esquerda JE. (2014) Accumulation of misfolded SOD1 in dorsal root ganglion degenerating proprioceptive sensory neurons of transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis. *Biomed Res Int*. 2014: 852163.
- 5) Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW and Milligan C. (2013a) Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav*. 4: 335 – 350.
- 6) Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, Prevette D, Caress J, Oppenheim RW and Milligan C. (2013b) Characterization of early pathogenesis in the SOD1G93A mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav*. 4: 431 – 457.