

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 川本裕子

横浜市立大学大学院医学研究科 神経内科学・脳卒中医学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	組織学	主任教授	大保 和之
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	脳神経外科学	准教授	立石 健祐
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	精神医学	准教授	浅見 剛

## 博士の学位論文審査結果の要旨

Phosphorylated CRMP1, axon guidance protein, is a component of spheroids and is involved in axonal pathology in amyotrophic lateral sclerosis

(軸索ガイダンス分子であるリン酸化 CRMP1 は ALS のスフェロイドに存在し、ALS の病態と関連する)

学位論文の審査にあたり、冒頭で申請者により、以下のように学位研究の要旨が説明された。

### 【序章】

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、運動皮質の上位運動ニューロンと、脳幹および脊髄の下位運動ニューロンの両方が選択的に失われることによって引き起こされる致死性かつ進行性の神経変性疾患である。ALS の分子病態に関しては、複数の仮説が提唱されており、なかでも細胞骨格障害と軸索輸送の障害は重要である(van Es et al. 2017)。軸索輸送障害と関連する運動ニューロンの病理学的異常として、神経変性が細胞体に先行して神経筋接合部を含む軸索遠位端に始まり、次第に「dying back」により近位に進行していくことが知られている。しかし、その分子病態には不明な点が多い。軸索ガイダンス分子の神経疾患病態への関わりが近年報告されており、反発性軸索ガイダンス分子である semaphorin-3A (Sema3A) は、ALS のマウスモデルの遠位軸索近くのシュワン細胞で高度に発現している(De Winter et al. 2006)。Sema3A はそのシグナル伝達経路の下流で, collapsin response mediator proteins (CRMPs) をリン酸化することが知られている。本研究では、ALS の軸索病態における Sema3A- CRMP シグナル伝達の関与を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

リン酸化 Thr509-CRMP1 (pThr509-CRMP1) に対する抗体を作成し、免疫組織染色、ウエスタンブロッティングを用いて、抗体の特異性を確認した。ヒト胎児腎臓 (HEK) 293T 細胞に cyclin-dependent kinase 5 (Cdk5) をトランスフェクションし、Cdk5 の有無による Thr509-CRMP1 のリン酸化を検証した。マウスを用いた実験について、横浜市立大学医学部の研究倫理審査委員会 (FA16-069) によって承認され、すべての手順は、横浜市立大学医学部の施設内動物管理使用委員会のガイドラインに従って実施された。またヒト剖検サンプルの使用は、横浜市立大学医学部の研究倫理審査委員会 (B090903014) によって承認され、剖検組織を含むすべての実験について書面によるインフォームドコンセントを得た。35 例の孤発性 ALS 患者と 7 例の疾患コントロール患者腰髄において、pThr509-CRMP1 の発現を、免疫組織学

染色で検討した。さらに、ALS の軸索において古典的なリン酸化タンパク質として知られているリン酸化ニューロフィラメント (pNF) との関係や、罹病期間を含む ALS 臨床情報との関係性を検証した。一方で、マウス神経芽細胞腫 (Neuro2a) 細胞株に野生型 CRMP1 とリン酸化を模倣した CRMP1 変異体をトランスフェクションし、それぞれが神経突起伸長に与える影響について *in vitro* で検証した。

### 【結果】

抗 pThr509-CRMP1 抗体が CRMP1 に特異的に反応することを、Crmp1 ノックアウトマウスを用いてウエスタンブロッティング、免疫組織染色で確認した。また、ヒト組織の免疫組織学染色でペプチドブロック、アルカリフォスファターゼ染色を行い、抗体の特異性を確認した。さらに、HEK293T 細胞へのトランスフェクションで、Thr509-CRMP1 は Cdk5 によりリン酸化を受けることを、ウエスタンブロッティングを用いて確認した。

ALS 患者の L4-5 腰髄の免疫組織染色では、pThr509-CRMP1 は腫大する近位軸索 (スフェロイド) に蓄積し、スフェロイドの主要な構成タンパク質である pNF と共局在していることを見いだした。35 例の孤発性 ALS 患者と 7 例の疾患コントロール患者腰髄で、前角面積あたりの pThr509-CRMP1 陽性のスフェロイド数を検証し、ALS 患者群では疾患コントロール群と比べ、pThr509-CRMP1 陽性スフェロイド数が有意に多いことを明らかにした。

次に、評価可能な 18 例の ALS 患者のスフェロイド免疫染色で、スフェロイドの pThr509-CRMP1 および pNF の平均蛍光輝度とそれに対する罹病期間の影響を検討したところ、pThr509-CRMP1 の平均蛍光輝度は、罹病期間が短い患者で高く、罹病期間が長くなるにつれて、減少していた。逆に pNF の平均蛍光輝度は罹病期間が短い患者で低く、罹病期間が長くなるにつれ増加していた。そして、蛍光輝度の pThr509-CRMP1:pNF 比は罹病期間と逆相関していた。また、*in vitro* で擬似リン酸化 CRMP1 変異体を Neuro2A 細胞に過剰発現させると、野生型 CRMP1 と比較して神経突起伸長を阻害した。

### 【考察】

本研究の結果、pThr509-CRMP1 が pNF に先行してヒト ALS 運動ニューロン軸索のスフェロイドに蓄積していることを明らかにした。このことは、pThr509-CRMP1 の蓄積が ALS 病理の一つの特徴であるスフェロイドの形成過程において、比較的病初期から関与している可能性を示唆している。また細胞モデルで Thr509 のリン酸化を模倣した CRMP1 において、野生型 CRMP1 と比較し神経突起伸長が阻害された実験結果と併せると、Sema3A- CRMP カスケードの亢進による過剰な CRMP1 のリン酸化は、初期の遠位軸索機能障害に関与すると考えられた。そして CRMP1 のリン酸化が軸索輸送の障害を介し遠位から近位への軸索障害の進行を促進し、輸送障害によりリン酸化 CRMP1 (pCRMP1) が近位軸索にスフェロイドとして蓄積す

るといふ病態モデルを提唱した。pCRMP1の蓄積がpNFの蓄積に先行したことは、現在、ALSの疾患進行バイオマーカーとして用いられているpNFに加え、pCRMP1も病態初期を反映するバイオマーカー候補として検討する価値があると考えられる。

#### 【結語】

軸索ガイダンス分子であるpCRMP1はALSのスフェロイドに存在し、ALSの病態と関連する。

上記内容について、研究報告の説明が行われた後、以下の質疑応答がなされた。

#### 立石副査の質疑応答

1. CRMP1は軸索に対して、どのように作用しているか。

申請者回答：Sema3Aにより機能がスイッチングされ、軸索伸張がコントロールされている。CRMP1単独の報告は多くはないが、CRMP1がアクチンを結合し、Sema3A刺激によってアクチンの結合が抑制され、軸索伸張に関与している報告がある。

2. 治療候補となりうるか。

申請者回答：Sema3A-CRMP経路は、ALSの根本原因というわけではなく、ALSの病態において障害された神経の治癒を妨げ、病状の進行を促進している可能性が高いと考えている。このことから発症したALS患者の進行抑制に役立つ可能性がある。現在、治療薬が乏しい中で、根治療法でなくとも重要な意味があると考えられる。

3. どの程度、自分自身で行ったか。

申請者回答：抗体作成はすでになされていたが、抗体が使用可能であるかどうかの特異性の判定や病理学的検証など、全て自ら試行した。

#### 浅見副査の質疑応答

1. 病理で用いた組織は、腰髄のどの部分か。

申請者回答：一般に使用されるL4-5を使用した。腰膨大にあたり、評価しやすい部位である。症状との関連を検証するために頸髄も観察したが、評価しにくいことと、サンプルが集めにくいことから断念した。

2. 当初35例あったALS検体が、最終的に評価可能であったのが18例となったのは何故か。

スフェロイドの評価を行うため、スフェロイドが観察されなかった検体が除かれた。また研究経過中に検体を消費してなくなってしまい、除かれた例もある。

3. ALS の病因仮説については、何か最も有力なのか.

申請者回答：さまざまな説があるものの、単独で ALS の原因を説明できるものはないと思われる.

4. 血液中の CRMP2 のリン酸化は、統合失調症において精神科の野本先生が評価しているが、今後 ALS における CRMP1 のリン酸化はどのように評価するか.

申請者回答：また開始していない. 野本先生にやり方を教わって、同様のやり方を検討している.

#### 大保主査の質疑応答

1. 疾患コントロール群の腰髄にもリン酸化 CRMP1 陽性スフェロイドは見られたのか.

申請者回答：ALS と比較して、スフェロイドの数は少ないものの観察された. このことから、Sema3A-CRMP1 カスケードの亢進は ALS に特異的なものではないと考えている.

2. CRMP1 のリン酸化の割合がどのように作用するか.

申請者回答：正常な状態であれば、Sema3A によって、リン酸化と非リン酸化がスイッチングされていると考えられるが、ALS においては、何らかのきっかけにより Sema3A の働きが過剰となり、CRMP1 がリン酸化に偏っている. それにより軸索輸送の障害や、軸索の伸張阻害、障害を受けた軸索の治癒の阻害も起こると考えられる.

以上の質疑応答の結果、本論文は、横浜市立大学医学博士号（甲号）の学位授与に値すると判断された.

.....