

学位論文の要旨

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)

March, 2023

(2023 年 3 月)

Yuko Kawamoto

川本 裕子

Neurology and Stroke Medicine
Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻

神経内科学・脳卒中医学

(Doctoral Supervisor : Fumiaki Tanaka, Professor)

(指導教員 : 田中 章景 教授)

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)

<https://doi.org/10.3389/fneur.2022.994676>

【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, ウェ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. 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.

マウスを用いた実験は、横浜市立大学医学部の研究倫理審査委員会 (FA16-069) の承認を受けており、すべての手順は、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した。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) の承認の下、剖検組織を用いた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。

【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う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。

【引用文献】

De Winter, F., Vo, T., Stam, F. J., Wisman, L. A. B., Bar, P. R., Niclou, S. P., van Muiswinkel, F. L. and Verhaagen, J. (2006) The expression of the chemorepellent Semaphorin 3A is selectively induced in terminal Schwann cells of a subset of neuromuscular synapses that display limited anatomical plasticity and enhanced vulnerability in motor neuron disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 32, 102-117.

van Es, M. A., Hardiman, O., Chio, A., Al-Chalabi, A., Pasterkamp, R. J., Veldink, J. H. and Van den Berg, L. H. (2017) Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 390, 2084-2098.

論文目録

I 主論文

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

Kawamoto Y., Tada M., Asano T., Nakamura H., Jitsuki-Takahashi A., Makihara H., Kubota S., Hashiguchi S., Kunii M., Ohshima T., Goshima Y., Takeuchi H., Doi H., Nakamura F., Tanaka F.

Frontiers in Neurology (2022) 13, 994676.

doi: 10.3389/fneur.2022.994676

II 副論文

なし

III 参考論文

1 Inhibition of Crmp1 phosphorylation at Ser522 ameliorates motor function and neuronal pathology in amyotrophic lateral sclerosis model mice

Asano T., Nakamura H., Kawamoto Y., Tada M., Kimura Y., Takano H., Yao R., Saito H., Ikeda T., Komiya H., Kubota S., Hashiguchi S., Takahashi K., Kunii M., Tanaka K., Goshima Y., Nakamura F., Takeuchi H, Doi H. and Tanaka F.

eNeuro. (2022) 9, 0133-22.

doi: 10.1523/ENEURO.0133-22.2022