

200935062A

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症患者由来疾患モデル細胞を用いた

病態解明と治療法開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋 良輔

分担研究者 井上 治久

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

筋萎縮性側索硬化症患者由来疾患モデル細胞を用いた

病態解明と治療法開発

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 高橋 良輔

分担研究者 井上 治久

平成 22 (2010) 年 3 月

目次

I 総括・分担研究報告

1. 筋萎縮性側索硬化症患者由来疾患モデル細胞を用いた病態解明と治療法開発
高橋 良輔

3

2. 分担課題：筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞のアストロサイトへの分化誘導とその治療的応用
井上 治久

6

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

8

III. 研究成果の刊行物・別刷り

14

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞を用いた病態解明と治療法開発に関する研究

研究代表者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授

研究要旨: 変異 SOD1 を有する遺伝性筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) においては、変異 SOD1 を有するアストロサイトによる運動ニューロン変性加速 (非自律性神経変性) が生じる。これまでの研究から、アストロサイトの有する SOD1 転写抑制が治療効果を有する可能性がある。本研究では、ヒトアストロサイト細胞株を用いて SOD1 転写活性を抑制する低分子化合物・既存薬を同定した。今後、ヒトアストロサイト、ALS モデルマウスを用いたスクリーニングにより、ALS に対する治療薬を同定することを試みる。

A. 研究目的

神経変性疾患では、特定の神経系が脆弱性を有し、選択的神経変性を生じる。最近の研究において、グリア細胞がその神経変性に寄与していることが明らかになりつつある。変異 SOD1 を有する遺伝性筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) においては、変異 SOD1 を有するアストロサイトが運動ニューロン変性を加速すると考えられている。また、アストロサイトの SOD1 タンパク質量を減少させることが治療効果を有する可能性がある。本研究では、アストロサイトの SOD1 タンパク質量を減少させる可能性のある低分子化合物・既存薬候補を同定し、最終的に、ALS 治療薬を発見することを目的としている。

B. 研究方法

ヒト SOD1 のゲノムを用いて、SOD1 の promoter 制御下に分泌型ルシフェラーゼを発現するベクターを構築する。ヒトアストロサイト細胞株にそのベクターを導入し、恒常的に分泌型ルシフェラーゼを発現するクローンを樹立する。上清のルシフェラーゼを測定し、SOD1 転写活性を抑える低分子化合物もしくは既存薬を同定する。すでに細胞死を誘発することにより SOD1 の転写を抑制することが知られているマイトマイシン C を陽性対照として用いる。ルシフェラーゼ活性測定で同定された低分子化合物・既存薬の中で、さらに ELISA で SOD1 発現量を低下させ、WST-1 アッセイで毒性を有さない低分子化合物・既存薬をスクリーニングする。また、低分子化合物 (もしくは既存薬) の濃度依存性に SOD1 の転写が抑制されるかを検討する。

以上の 1 次スクリーニングの後、さらに研究分担者 (井上) による、ALS 患者 iPS 細胞由来アストロサイトでの 2 次スクリーニングを行う。

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医学部倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究』(承認番号第 824 番) および『ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第 G259) として承認されている。ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守するものである。

C. 研究結果

約 10,000 種類の低分子化合物のうち、濃度依存性に SOD1 の発現量を減少させる 177 種類の化合物といくつかの既存薬を一次スクリーニングで同定した (Z' -factor は、0.5~1.0)。

同定した既存薬の中には、変異 SOD1 マウスを用いた治療実験で治療効果を示されているものも含まれていた。WST-1 アッセイでその効果が細胞毒性によるものであることを除外し、ELISA で SOD1 タンパク質量の実際の発現低下を 177 のヒットの内 10 化合物で確認した。その中で最も効果の高い 2 化合物に構造式類似の既存薬でも同様の結果を見出し、ウェスタンブロッティングで SOD1 タンパク質量が実際に減少していることを確認した。

D. 考察

変異 SOD1 による遺伝性 ALS モデルマウスの研究から、変異 SOD1 を有するアストロサイトが毒性を有し、運動ニューロン変性を加速させると考えられ、治療薬スクリーニングの標的細胞となりうると考えられている。本研究により、遺伝性 ALS 標的細胞アストロサイトの有する標的分子 SOD1 の発現モニタリングシステムとそれを用いたアッセイ系を確立した。今後、同定した低分子化合物・既存薬が SOD1 転写を抑制するメカニズムを検討する。また、ヒトアストロサイトを用いた 2 次スクリーニング、遺伝性 ALS モデルマウスを用いた 3 次スクリーニングの治療実験を行う予定である。

E. 結論

ヒトアストロサイト細胞株において、細胞死を生じることなく、SOD1 転写活性を低下させる低分子化合物・既存薬を同定した。

F. 健康危険情報

なし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

村上 学、井上治久、高橋良輔 (2009) : 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の治療戦略、*ファルマシア*、45 :

高橋良輔 (2009) : パーキンソン病の神経細胞移植治療、日本医事新報、4445 : 79-80

Takahashi R. (2009) Edaravone in ALS. (commentary) **Exp Neurol.** 217:235-6

Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, Takahashi R., Shimohama S (2009) Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. **J Neurosci Res.** 87:576-85.

Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, Takahashi R., Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A. (2009) N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio. **J. Neurochem** 108(2): 350-60.

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, Takahashi R. (2009) Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach. **Auton Neurosci.** 146:33-5.

Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, Takahashi R., Kawamura T (2009) Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease. **Eur J Neurol.** 16:174-82.

Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, Takahashi R. (2009) Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia? **Epilepsia** 50:2072-84.

Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, Takahashi R., Tomimoto H (2009) Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia. **Neuroreport** 20:990-6.

Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, Takahashi R., Chiba T (2009) Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers. **Int J Cancer** 125: 2029-35.

Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, Takahashi R. (2009) Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice. **Brain Res.** 1294:202-10.

Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, Takahashi R. (2009) Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA). **Intern Med.** 48:1307-9.

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, Takahashi R. (2009) A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish. **Neurosci Res.** 65:263-71.

Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, Takahashi R. (2009) Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families. **Epilepsia.** 2009 Sep 22. [Epub ahead of print]

Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsubashi M, Takahashi R., Fukuyama H. (2009) Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. **Clin Neurophysiol.** 120: 1923-6.

Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, Takahashi R., Mizutani T. (2009) Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study. **J Neuropathol Exp Neurol.** 68:1084-91.

Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, Takahashi R., Shimohama S, Sawada H. (2009) Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009 Nov 11. [Epub ahead of print]

Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, Takahashi R. (2010) Loss of PINK1 in medaka fish (*Oryzias latipes*) causes late-onset decrease in spontaneous movement. **Neurosci Res.** 66:151-61.

Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, Takahashi R. (2010) PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391:1240-5.

Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y., Suzuki Y., Ihara M, Kawamata J, Akiyuchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, Takahashi R. (2010) HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis. **Neuropath. Appl. Neurobiol.** in press.

2. 学会発表

高橋良輔：孤発性パーキンソン病の病因：
環境要因とリスク遺伝子。第50回日本神経
学会総会、仙台（2009. 5. 22）

高橋良輔：パーキンソン病の最新の治療と
展望。平成21年度日本内科学会生涯教育講
演会、仙台（2009. 9. 6）

高橋良輔：家族性パーキンソン病の分子
メカニズムー神経保護治療に向けてー
シンポジウム「神経変性疾患の分子標的治療
への新たな展開」、第32回日本神経科学
学会、名古屋（2009. 9. 18）

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

出願中

名称:筋萎縮性側索硬化症の予防および治療用医薬組
成物

番号:61/286,134

種類:特許(米国)

出願年月:2009/12/14

(発明者):天貝裕地/饗庭一博/中辻憲夫/高橋良輔/村
上学/井上治久/北岡志保/月田香代子(敬称略)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
（分担）研究報告書

筋萎縮性側索硬化症由来疾患モデル細胞のアストロサイトへの分化誘導とその治療的応用

研究代表者 高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授

研究要旨:変異 SOD1 による遺伝性筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) モデルマウスを用いた研究から、変異 SOD1 を有するアストロサイトの SOD1 タンパク質量を低下させることが治療効果を有することが考えられる。本研究では、変異 SOD1 を有する ALS 由来 iPS 細胞より分化誘導したアストロサイトで SOD1 タンパク質量を低下させる既存薬を同定した。

研究分担者:井上治久
京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

A. 研究目的

本研究は筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) 患者由来 iPS 細胞を用いることにより、これまで入手困難であった患者由来の神経系細胞を作製し、それらの細胞を用いて、創薬スクリーニングを行い、治療薬候補を同定することを目標としている。最終的には、ALS の克服を目的としている。

B. 研究方法

本申請研究では、患者さんへの適切な説明及びそれに基づく同意取得の下、皮膚線維芽細胞を培養し、レトロウイルスを用いてiPS細胞を作製した。さらにアストロサイトへ分化誘導し、既存薬を投与し、SOD1タンパク質量をウェスタンブロットにて解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は京都大学医学部倫理委員会により、課題名『ヒト疾患特異的 iPS 細胞の作製とそれを用いた疾患解析に関する研究』(承認番号第 824 番)および『ヒト疾患特異的 iPS 細胞を用いた遺伝子解析研究』(承認番号第 G259)として承認されている。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守するものである。

C. 研究結果

変異 SOD1 を有する遺伝性 ALS 患者皮膚由来 iPS 細胞を樹立した。iPS 細胞は、ES 細胞マーカーを発現し、ES 細胞様分化能は、免疫不全マウスへの移植により、3 胚葉への分化を認めたことより確認された。また、変異 SOD1 を有する iPS 細胞をアストロサイトへ分化誘導し、ヒトアストロサイト細胞株を用いて同定していた SOD1 の転写を抑制する既存薬が、遺伝性 ALS 患者皮膚由来 iPS 細胞より分化誘導した変異 SOD1 を有するアストロサイトにて、SOD1 の発現量を低下させることを確認した。

D. 考察

変異 SOD1 による遺伝性 ALS モデルマウスの研究で有効性が確認された治療薬のうち、ヒト ALS において有効であった治療薬はこれまでに同定されていない。モデルマウスがヒトの細胞と異なることが原因の 1 つと考えられ、本研究で使用したヒト iPS 細胞由来の細胞がこれまでの治療薬スクリーニング方

法を補完する可能性がある。

E. 結論

変異 SOD1 を有する ALS 患者さん由来 iPS 細胞より分化誘導したアストロサイトで SOD1 タンパク量を低下させる既存薬を同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

・村上 学、井上治久、高橋良輔(2009): 筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略、ファルマシア、45、1009-1112

2. 学会発表

・井上治久・運動ニューロン疾患における iPS 細胞の可能性・SMA 家族の会・京都、2009 年 5 月 16 日

・井上治久・疾患特異的 iPS 細胞を用いた ALS 研究・放射線分子疫学セミナー・広島、2009 年 7 月 2 日

・Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research・International Symposium: New Approach for Molecular Neuropathology, Tokyo, Japan. 2009 Aug 13.

・井上治久・疾患 iPS 細胞の樹立から臨床応用へ・第 2 回 iPS 細胞樹立・維持培養の講習会・京都、2009 年 8 月 26 日

・井上治久・Translational Neuroscience based on iPS cell Technology iPS 細胞作製技術を用いた神経科学研究・第 30 回再生医療・臓器再建医学コースミーティング・京都、2009 年 9 月 11 日

・Inoue H・Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research・The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan. 2009 Sep 16.

・井上治久・疾患特異的 iPS 細胞を用いた神経変性疾患研究・倉敷神経内科疾患フォーラム・倉敷、2009 年 10 月 2 日

- ・ Inoue H ・ Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research ・ The Workshop, San Francisco, USA. 2009 Jun 8.
- ・ Inoue H ・ Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research ・ Sweden-Japan Joint Colloquium: Advances in Cellular Reprogramming and Stem Cell Biology, Stockholm, Sweden. 2009 Sep 5.
- ・ Inoue H ・ Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research ・ 5th Symposium sur la SLA, Quebec, CANADA. 2009 Sep 25.
- ・ Inoue H ・ Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research ・ Gladstone Institute of Cardiovascular Disease: Seminar, San Francisco, USA. 2009 Oct 26.
- ・ Inoue H ・ Neurodegenerative disease-specific induced Pluripotent Stem cells research ・ Joint iPS Meeting, Toronto, CANADA. 2009 Oct 28.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

出願中

名称: 筋萎縮性側索硬化症の予防および治療用医薬組成物

番号: 61/286,134

種類: 特許(米国)

出願年月: 2009/12/14

(発明者): 天貝裕地/饗庭一博/中辻憲夫/高橋良輔/村上学/井上治久/北岡志保/月田香代子(敬称略)

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上 学、井上治 久、高橋良輔	萎縮性側索硬化症(ALS) の治療戦略	ファルマシア	45	1009-1112	2009
高橋良輔	パーキンソン病の神経細 胞移植治療	日本医事新報	4445	79-80	2009
<u>Takahashi R</u>	Edaravone in ALS. (commentary)	Exp Neurol.	217	235-6	2009
Takeuchi H, Yanagida T, Inden M, Takata K, Kitamura Y, Yamakawa K, Sawada H, Izumi Y, Yamamoto N, Kihara T, Uemura K, Inoue H, Taniguchi T, Akaike A, <u>Takahashi R</u> , Shimohama S	Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models.	J Neurosci Res.	87	576-85	2009
Uemura K, Lill CM, Banks M, Asada M, Aoyagi N, Ando K, Kubota M, Kihara T, Nishimoto T, Sugimoto H, <u>Takahashi R</u> , Hyman BT, Shimohama S, Berezovska O, Kinoshita A	N-cadherin-based adhesion enhances Abeta release and decreases Abeta42/40 ratio.	J. Neurochem.	108	350-60	350-60

Kondo T, Inoue H, Usui T, Mimori T, Tomimoto H, Vernino S, <u>Takahashi R.</u>	Autoimmune autonomic ganglionopathy with Sjögren's syndrome: significance of ganglionic acetylcholine receptor antibody and therapeutic approach.	Auton Neurosci.	146	33-35	2009
Sawada H, Oeda T, Yamamoto K, Kitagawa N, Mizuta E, Hosokawa R, Ohba M, Nishio R, Yamakawa K, Takeuchi H, Shimohama S, <u>Takahashi R.</u> Kawamura T	Diagnostic accuracy of cardiac metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson disease.	Eur J Neurol.	16	174-82	2009
Ikeda A, Hirasawa K, Kinoshita M, Hitomi T, Matsumoto R, Mitsueda T, Taki JY, Inouch M, Mikuni N, Hori T, Fukuyama H, Hashimoto N, Shibasaki H, <u>Takahashi R.</u>	Negative motor seizure arising from the negative motor area: is it ictal apraxia?	Epilepsia	50	2072-84	2009
Okamoto Y, Ihara M, Fujita Y, Ito H, <u>Takahashi R.</u> Tomimoto H	Cortical microinfarcts in Alzheimer's disease and subcortical vascular dementia.	Neuroreport	20	990-6	990-6
Ikeuchi K, Marusawa H, Fujiwara M, Matsumoto Y, Endo Y, Watanabe T, Iwai A, Sakai Y, <u>Takahashi R.</u> Chiba T	Attenuation of proteolysis-mediated cyclin E regulation by alternatively spliced Parkin in human colorectal cancers.	Int J Cancer	125	2029-35	125
Kitaguchi H, Tomimoto H, Ihara M, Shibata M, Uemura K, Kalaria RN, Kihara T, Asada-Utsugi M, Kinoshita A, <u>Takahashi R.</u>	Chronic cerebral hypoperfusion accelerates amyloid beta deposition in APPSwInd transgenic mice.	Brain Res.	1294	202-10	2009

Kobayashi K, Okamoto Y, Inoue H, Usui T, Ihara M, Kawamata J, Miki Y, Mimori T, Tomimoto H, <u>Takahashi R</u>	Leukoencephalopathy with cognitive impairment following tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis (RA).	Intern Med.	48	1307-9	2009
Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Uemura K, Takeda S, <u>Takahashi R</u>	A chemical neurotoxin, MPTP induces Parkinson's disease like phenotype, movement disorders and persistent loss of dopamine neurons in medaka fish.	Neurosci Res.	65	263-71	2009
Kawamata J, Ikeda A, Fujita Y, Usui K, Shimohama S, <u>Takahashi R.</u>	Mutations in LGI1 gene in Japanese families with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy: The first report from Asian families.	Epilepsia	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2009
Usui K, Ikeda A, Nagamine T, Matsubayashi J, Matsumoto R, Hiraumi H, Kawamata J, Matsuhashi M, <u>Takahashi R.</u> Fukuyama H	Abnormal auditory cortex with giant N100m signal in patients with autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy.	Clin Neurophysiol.	120	1923-6	2009
Uyama N, Uchihara T, Mochizuki Y, Nakamura A, <u>Takahashi R.</u> Mizutani T.	Selective nuclear shrinkage of oligodendrocytes lacking glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy: a 3-dimensional volumetric study.	J Neuropathol Exp Neurol.	68	1084-91	2009
Yamakawa K, Izumi Y, Takeuchi H, Yamamoto N, Kume T, Akaike A, <u>Takahashi R.</u> Shimohama S, Sawada H	Dopamine facilitates alpha-synuclein oligomerization in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.	Biochem Biophys Res Commun.	Epub ahead of print	Epub ahead of print	2009
Matsui H, Taniguchi Y, Inoue H, Kobayashi Y, Sakaki Y, Toyoda A, Uemura K, Kobayashi D, Takeda S, <u>Takahashi R</u>	Loss of PINK1 in medaka fish (<i>Oryzias latipes</i>) causes late-onset decrease in spontaneous movement.	Neurosci Res.	66	151-61	2010

Aoyagi N, Uemura K, Kuzuya A, Kihara T, Kawamata J, Shimohama S, Kinoshita A, <u>Takahashi R.</u>	PI3K inhibition causes the accumulation of ubiquitinated presenilin 1 without affecting the proteasome activity.	Biochem Biophys Res Commun.	391	1240-5	2010
Kawamoto Y, Ito H, Kobayashi Y, Suzuki Y, Ihara M, Kawamata J, Akiguchi I, Fujimura H, Sakoda S, Kusaka H, Hirano A, <u>Takahashi R.</u>	HtrA2/Omi-immunoreactive intraneuronal inclusions in the anterior horn from patients with sporadic and SOD1 mutant amyotrophic lateral sclerosis.	Neuropath Appl Neurobiol.	in press.	in press.	2010

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
村上 学、井上治 久、高橋良輔	萎縮性側索硬化症(ALS) の治療戦略	ファルマシア	45	1009-1112	2009

研究成果の刊行物・別刷り

ファルマシア

別刷

筋萎縮性側索硬化症(ALS)の治療戦略

村上 学

Gaku MURAKAMI

京都大学大学院医学研究科
臨床神経学大学院生

井上治久

Haruhisa INOUE

京都大学物質-細胞統合システム拠点
iPS 細胞研究センター准教授

高橋良輔

Ryosuke TAKAHASHI

京都大学大学院医学研究科
臨床神経学教授

1 はじめに

神経変性疾患は、特定の神経系が選択的に変性・細胞死を生じる疾患の総称である。神経変性疾患の神経病理学的な特徴は、神経細胞及び非神経細胞の内外に認められる脳内のタンパク質凝集物(封入体)である。そのうち筋萎縮性側索硬化症(ALS)は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性していく疾患である。40~70歳代で発症し、平均発症年齢は約65歳である。通常発症後四肢及び球麻痺が進行性の経過をたどり、3~5年で呼吸不全などで死亡することが多い。ALSの約90%は孤発性、約10%は家族性である。¹⁾ 高次脳機能など、その他の神経系には目立った症状を認めず、運動神経が選択的に侵され、患者の苦痛が大きいこと、症状の重篤さにも関わらず有効な治療がないことより、治療方法の開発が精力的に行われてきた。

1993年に、家族性ALSの一部はCu/Zn superoxide dismutase(SOD 1)の変異による²⁾ことが発見された。その後の研究で、家族性ALSの約20%がSOD 1変異によるとされたが、最近の学会報告では日本では家族性ALSの50%前後がSOD 1変異による。また、孤発性ALSの数%がSOD 1変異によることも明らかになった。²⁾ 変異SOD 1は活性を残存しているものもあり、その活性低下と臨床経過とは相関せず、変異SOD 1タンパク質の毒性による運動神経変性と考えられる。

さらに最近になって、ALS患者剖検脳脊髄運動神経細胞のタンパク質凝集物の主要構成成分がtransactivation responsive element(TAR) DNA-binding protein of 43 kDa(TDP-43)であることが判明した。^{3,4)} 驚くべきことに、その後の遺伝学的解析によって、家族性及びごく一部の一見孤発性にみえるALSが、TDP-43遺伝子の変異によって発症す

ることも次々と報告された。⁵⁾

本稿では、SOD 1及びTDP-43の関与するALSの治療戦略について概説する。

2 ALSの病態仮説

SOD 1関連ALS

ALSの病態モデルとして、変異SOD 1トランスジェニックマウスによる研究が精力的に行われ、様々な病態仮説が提唱されている。酸化ストレス、グルタミン酸による興奮毒性、炎症性機序、ミトコンドリア異常、軸索輸送障害、小胞体ストレス、ユビキチン・プロテアソームシステムやオートファジーなどのタンパク質品質管理機構の破綻、凝集タンパク質による細胞毒性などである。

また変異SOD 1トランスジェニックマウスモデルの解析により、変異SOD 1が神経細胞に対して毒性を発揮するだけでなく(自律性神経細胞毒性)、アストロサイトやミクログリアといった非ニューロン細胞内の変異SOD 1タンパク質発現が、ニューロンの変性を促進するという、非自律性神経細胞毒性機序も報告されている。^{6,7)}

しかし変異SOD 1患者及びモデルマウスでは、一部報告⁸⁾を除いて細胞内TDP-43タンパク質凝集がみられず、核移行性の変化も原則的にはみられない⁹⁾ため、孤発性ALSのモデルとしては問題点が指摘されている。

TDP-43関連ALS

近年発表されたTDP-43の病態仮説については、さらに他の機序が提唱されている。ALS患者剖検組織においてはTDP-43のリン酸化^{3,10)}カスパーゼによる切断¹¹⁾がみられ、TDP-43に対する免疫組織染色では核の染色性が失われ細胞質に移行する。^{3,4)} TDP-43はRNA結合ドメインを持ち、種々のRNA及びタンパク質に結合して、核内において

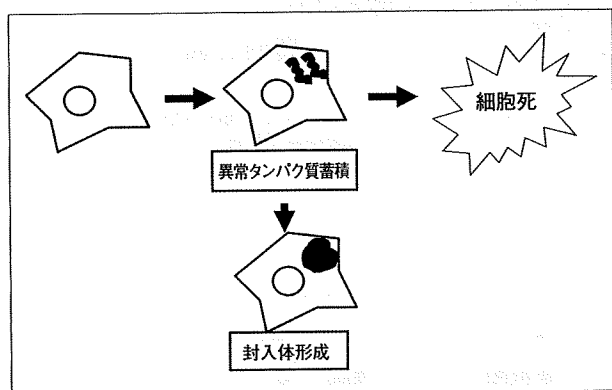


図1 異常タンパク質による細胞毒性

異常タンパク質が蓄積すると、それを分解するだけでなく、封入体に凝集して無毒化する。しかし、細胞の処理能力を超えるタンパク質が蓄積すると、細胞死を引き起こす。

mRNA のスプライシングなどを行っている。¹²⁾ そのため、細胞内の修飾された TDP-43 の核移行が低下することにより核内の TDP-43 の機能低下を来とし、毒性を発揮するという機能喪失モデルも提唱されている。

他の神経変性疾患同様、変異タンパク質が毒性を獲得して神経細胞障害、細胞死を起こす可能性も考えられる (gain of toxic function モデル) (図1)。細胞内では、異常タンパク質を分解したり、無毒な封入体に凝集させることで対応していくと考えられるが、その防御機構を超えて異常タンパク質が蓄積すると細胞毒性を発揮して細胞死を引き起こすものと考えられる。

3 ALS 治療開発の現状

先述のように、ALS では変異 SOD1 トランスジェニックマウスが家族性 ALS の病態モデルとして確立しており、その動物モデルによる治療法開発が行われている。例えば、酸化ストレスに対し抗酸化剤であるビタミン E や、ミトコンドリア機能改善目的にコエンザイム Q₁₀ で運動神経症状の進行を遅延し生存期間を延長し、有効性が認められた。¹³⁾ また、シクロオキシゲナーゼを抑制し抗炎症作用を有するミノサイクリンなども有効性が認められた。¹³⁾

また、アストロサイトのグルタミン酸トランス

ポーター 1 の発現を上昇させる既存薬剤のハイスループット・スクリーニングを行い、第 3 世代セフェム系抗生物質であるセフトリアキソンが発見され、¹⁴⁾ ヒトへの臨床試験も行われている。

他に、神経栄養因子による神経保護を目指した治療も検討されている。インスリン様増殖因子 (IGF-1) などが有効性を認めた。¹³⁾

そのほか様々な治療アプローチがなされてきたが、いずれの薬剤も臨床試験で明確な有効性を証明できず、現在 ALS に対し有効性が証明された薬剤はグルタミン酸遊離阻害や興奮性アミノ酸受容体との非競合的阻害、電位依存性 Na⁺ チャンネル阻害等の作用を有するリルゾールのみである。しかしリルゾールによる延命効果は約 3 か月に留まり、筋力・運動機能の改善は望めず、その効果は限定的である。¹⁵⁾

4 SOD1 タンパク質量制御による家族性 ALS の治療法

変異 SOD1 トランスジェニックマウスでは、トランスジーンのコピー数が多いほど表現型が重篤である。¹⁶⁾ また、変異 SOD1 トランスジェニックラットでは、トランスジーンのコピー数の多いラットのみが ALS を発症し、コピー数の少ないラットでは発症しない。¹⁷⁾ したがって、変異 SOD1 に関連した ALS では、変異 SOD1 の量を減らすことが治療につながる可能性がある。

実際の実験治療として、RNA 干渉や antisense oligonucleotide を用いてタンパク質発現量を低下させることで病態を改善した、という報告がある。RNA 干渉を用いた実験¹⁸⁾ では、変異 SOD1 mRNA に相補的な siRNA を変異 SOD1 マウスにかけ合わせたダブルトランスジェニックマウスで、その生存期間が著明に延長したという報告がある。また、antisense oligonucleotide を脳室内に投与し、変異 SOD1 タンパク質の細胞内産生抑制を行ったマウスでも表現型の改善が見られる。¹⁹⁾

さらに、lox 配列で変異 SOD1 遺伝子を挟み SOD1 本来のプロモーターで変異 SOD1 を発現して、通常の変異 SOD1 マウスと同様に ALS を発症するトランスジェニックマウスを組織特異的 Cre

発現マウスとかけ合わせることによって、運動ニューロンでのみ変異 SOD1 発現を低下させると ALS の発症が遅延し、ミクログリアでのみ変異 SOD1 発現を低下させると疾患の進行を遅らせたという報告がある。⁶⁾ 同様の手法で、アストロサイト内変異 SOD1 発現低下により疾患の進行を遅らせたという報告もある。⁷⁾

他の神経変性疾患モデルでも、原因タンパク質発現量を減少させることで治療につながる可能性が示唆されている。ハンチントン病はハンチンチン (Htt) というタンパク質のポリグルタミン (polyQ) が異常に増えることで、そのタンパク質の凝集、神経細胞変性が認められる疾患であり、polyQ Htt を過剰発現するトランスジェニックマウスはハンチントン病のモデルとして知られている。そのマウスの polyQ 発現量を、Tet-Off システムを用いて後天的に減少させると、発症を抑えられたという報告がある。²⁰⁾ また、アルツハイマー病モデルである変異タウトランスジェニックマウスでも、同様のシステムで発現量を抑えることで、記憶機能の改善及び神経細胞変性の抑制が観察されている。²¹⁾

以上から、我々は SOD1 の転写を抑制して SOD1 タンパク質量を減少する低分子を、低分子化合物・既存薬ライブラリのハイスループット・スクリーニング・システム (図 2) を構築して、家族性 ALS 治療薬スクリーニングを行っている。我々は SOD1 の本来のプロモーターの支配下にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼを発現するコンストラクトを構築した。

化合物がプロモーターに作用し転写を抑制すれば、ルシフェラーゼの発現量が低下しルシフェラーゼの基質から産生される蛍光物質の量が低下する。アストロサイトが非自律性神経細胞死、疾患の進行に関連することから、ヒトアストロサイト由来の細胞株を使用している。また、ルシフェラーゼ反応基質を 96-ウェル・プレート上で自動分注後吸光度を測定する装置を用いて測定している。このような方法でこれまでに 9,600 種類の化合物をスクリーニングし、蛍光物質の産生を減少させる、すなわち SOD1 の転写を抑制する化合物を 177 種類見いだしており、これからさらに ALS モデル細胞や ALS

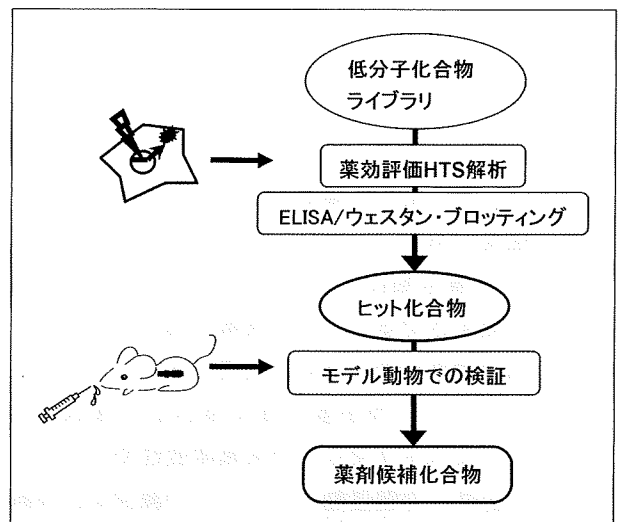


図 2 我々の ALS 治療開発戦略の概要

SOD1 プロモーター下にルシフェラーゼを発現するコンストラクトを導入した、ヒトアストロサイト由来細胞株を用いて、SOD1 転写を抑制する化合物をスクリーニングする。ELISA やウェスタン・ブロッティングで SOD1 タンパク質量を特異的に減少する化合物を抽出する。変異 SOD1 トランスジェニックマウスでその効果を確認する。

モデル動物での効果を確認して、臨床的に有用な化合物を絞り込んでいく予定である。低分子化合物は、大量生産が可能であり、安価で安定した供給を行うことが可能となる。また、既存薬を用いればヒトへの使用における安全性も既に確認されており、速やかな臨床への応用も可能となる。我々の開発した方法は、ALS 治療開発における新たなアプローチの 1 つとなるものと考えられる。

5 SOD1 タンパク質を減少させることによる問題点

SOD1 は細胞内に発生した superoxide radicals を過酸化水素に分解する酵素であり、抗酸化ストレス酵素の 1 つに挙げられる。したがって、SOD1 を減少させることは、酸化ストレス反応に対する脆弱性を来す可能性がある。

SOD1 ノックアウトマウスの解析によると、脊髄運動神経軸索を切断した後の神経細胞死が SOD1 非ノックアウトマウスに比して多く見られる。²²⁾ ほかに、神経筋接合部の形成不全や軸索変性が、高齢の SOD1 ノックアウトマウスで見られるという報告もある。²³⁾ したがって、SOD1 を大きく低下させることは脊髄運動神経変性を来す可能性

がある。

ただし、SOD1ノックアウトマウスの寿命は非ノックアウトマウスに比べ著変が見られない。²⁴⁾ さらに、SOD1ヘテロノックアウトマウスはノックアウトマウスに比して軸索切断による神経細胞死の程度が軽度である。²⁴⁾ また、他のアンチオキシダントによる代償も期待できるため、SOD1を特異的部分的に減少させることが、重篤な副作用を来たさずに、治療効果を得るために重要である。

さらに、コピー数が多い野生型SOD1遺伝子のトランスジェニックマウスでも軸索変性やミトコンドリアの変性、脊髄運動ニューロンの減少が、高齢になれば出現することが報告されている。²⁴⁾ 変異型SOD1と野生型SOD1のダブルトランスジェニックマウスは、野生型SOD1量に応じて進行が速くなるとの報告²⁴⁾もあり、野生型SOD1細胞内産生も制御する試みは相乗的に有効である可能性がある。

先述のように、他のアプローチで明らかな有効性を認めた治療がほとんどないこともあり、原因となる異常タンパク質を直接減少させるアプローチが有望と考えられることから、SOD1タンパク質量を減少させる有用性は、部分的特異的に行うことができれば、そのリスクよりも大きく、根本的な治療につながると思われる。

6 孤発性ALSに対する治療的アプローチ

先述のように、孤発性ALSではTDP-43タンパクの細胞質内封入体を認め、核における染色性が失われている。核移行シグナルを欠損させたTDP-43遺伝子ないし、易凝集性の高いC末端TDP-43遺伝子にGFPを付して導入したTDP-43凝集細胞モデルを用いて、タンパク質凝集を抑制させる薬剤が

報告されている。²⁵⁾

ただし、TDP-43に関連したALSの病態生理はまだ未解明の部分が多く、今後TDP-43の生理的機能及び変異TDP-43の神経細胞に対する影響の詳細な解析がまたれる。

7 おわりに

ALS、特に変異SOD1関連ALSの病態に沿った治療戦略について概説した。精力的な研究がなされてはいるが、未だ病勢を決定的に改善する薬剤は開発されていない。この難病に対する治療法が早く発見され、多くの患者が治療される日が来ることを望む。

文 献

- 1) Rosen D. R. et al., *Nature*, 362, 59-62 (1993).
- 2) Andersen P. M. et al., *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, 6, 37-46 (2006).
- 3) Arai T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351, 602-611 (2006).
- 4) Neumann M. et al., *Science*, 314, 130-133 (2006).
- 5) Lagier-Tourenne C. et al., *Cell*, 136, 1001-1004 (2009).
- 6) Boilee S. et al., *Science*, 312, 1389-1392 (2006).
- 7) Yamanaka K. et al., *Nat. Neurosci.*, 11, 251-253 (2008).
- 8) Shan X. et al., *Neurosci. Lett.*, 458, 70-74 (2009).
- 9) Mackenzie I. et al., *Ann. Neurol.*, 61, 427-434 (2007).
- 10) Hasegawa M. et al., *Ann. Neurol.*, 64, 60-70 (2008).
- 11) Zhang Y. J. et al., *J. Neurosci.*, 27, 10530-10534 (2007).
- 12) Buratti E. et al., *Front. Biosci.*, 13, 867-878 (2008).
- 13) Brujin L. et al., *Expert. Rev. Neurother.*, 6, 417-428 (2006).
- 14) Rothstein J. D. et al., *Nature*, 433, 73-77 (2005).
- 15) Miller R. G. et al., *Cochrane Database Syst. Rev.*, (1), CD 001447 (2007).
- 16) Dal Canto M. et al., *Brain Res.*, 676, 25-40 (1995).
- 17) Nagai M. et al., *J. Neurosci.*, 21, 9246-9254 (2001).
- 18) Saito Y. et al., *J. Biol. Chem.*, 280, 42826-42830 (2005).
- 19) Smith R. A. et al., *J. Clin. Invest.*, 116, 2290-2296 (2006).
- 20) Yamamoto A. et al., *Cell*, 101, 57-66 (2000).
- 21) SantaCruz K. et al., *Science*, 309, 476-481 (2006).
- 22) Reasume A. et al., *Nat. Genet.*, 13, 43-47 (1996).
- 23) Flood D. G. et al., *Am. J. Pathol.*, 155, 663-672 (1999).
- 24) Jaarsma D. et al., *Neurobiol. Dis.*, 7, 623-643 (2000).
- 25) Yamashita M. et al., *FEBS Lett.*, 583, 2419-2424 (2009).