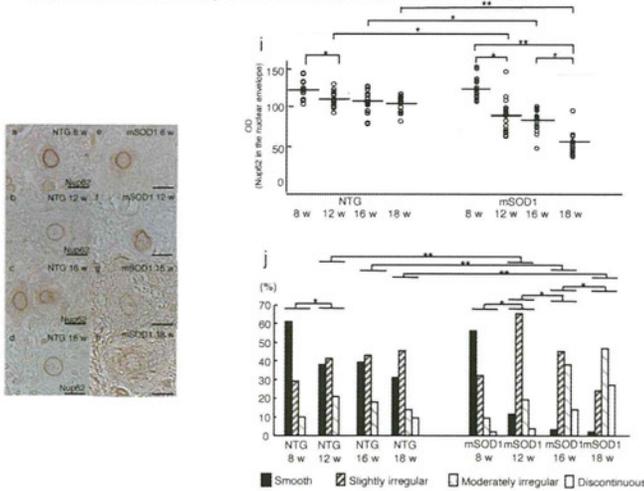


図 4

mSOD1-Tg mouse, non-transgenic mouse AHCsにおける Nup62の染色性、Nup62にて免疫染色した核膜の形態変化



次に、細胞質核輸送障害を反映する Nup62 の核膜上での不連続性を検討した結果、mSOD1-Tg マウスの病期の進行とともに有意に増加した (図 4)。

D. 考察

本研究の結果は、ALS および mSOD1-Tg マウスの脊髄前角細胞における HIF-1 α の細胞質核輸送障害の存在が臨床症状発現前から存在する事を新たに示唆する。今回の検討において、HIF-1 α と VEGF の細胞内での発現の乖離、および HIF-1 α とその細胞質核輸送担体である KAB の発症前期からの核内染色性の低下より、VEGF 作用不全の機序として従来指摘されていた前角細胞における VEGF 受容体の発現低下のみでなく、細胞質核輸送障害の関与が考えられた。細胞質内 HIF-1 α 増加の機序として、一般的には低酸素、pro-inflammatory cytokine (IL-1 β , TNF- α , EGF, IGF, FGF2 など)や変異 SOD1 蛋白等による prolyl hydroxylase (HIF-1 α の水酸化分解酵素)の活性阻害が報告されている。しかし今回の結果から、HIF-1 α の細胞質から核への輸送障害により細胞質内に蓄積する機序も考えられた。

細胞質核輸送障害は、TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)、fused in sarcoma /

translocated in liposarcoma (FUS)変異を有する家族性 ALS においても指摘されている。また triple A syndrome では、Nup62 遺伝子変異による KAB 依存性の細胞質核輸送障害が下位運動ニューロン変性に寄与する事が報告されている。以上の知見より、HIF-1 α などの転写因子、mRNA の輸送障害は細胞の生存に必要な蛋白合成抑制を引き起こし、運動ニューロン死を招く一つの機序として考慮される。

E. 結論

HIF-1 α の細胞質核輸送障害による核内 VEGF 産生抑制は、ALSの臨床症状発現に先行する早期の病態である可能性が、今回新たに示唆された。

F. 健康危険情報

健康危険情報として報告すべきものはない。

G. 研究発表

第 53 回日本神経学会学術大会にて学会報告を行った。

H. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得: なし
- 2) 実用新案登録: なし
- 3) その他: なし

ALS-FUS モデルショウジョウバエの解析

研究分担者 徳田隆彦^{1,2)}

研究協力者 東裕美子²⁾、水野敏樹²⁾、中川正法²⁾、島村真依³⁾、山口政光³⁾、永井義隆⁴⁾

1) 京都府立医科大学分子脳病態解析学(神経内科併任)、2) 京都府立医科大学神経内科学、3) 京都工芸繊維大学応用生物学、4) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第4部

研究要旨

現在同定されている家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因遺伝子の中で、*TDP43* および *FUS* は RNA 結合蛋白質で機能的類似性があり、ともに転写制御に関与するとされているが、その生体内の役割および ALS の病態発現機序は未だ明らかにされていない。本年我々は ALS-FUS の病態発現機序を検討する目的で、そのショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、*Caz* の機能喪失が運動能力の低下を来すことを報告した。この *Caz* を複眼特異的にノックダウンしたショウジョウバエを用いて、*Caz* と遺伝学的に相互作用する因子の網羅的なスクリーニングを開始した。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症(ALS)は *SOD1* に加えて 2006 年に *TDP43*、2009 年に *FUS* がその原因遺伝子として報告された(1-3)。*TDP43* や *FUS* は RNA 結合蛋白質で機能的類似性があり、ともに転写制御に関与するとされているが、その生体内の役割はまだ十分明らかにされていない。そこで我々は、*FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、その運動機能障害の病態の解析を行うことを計画した。

ショウジョウバエはヒト神経系を構成する遺伝子の約 75% のホモログを有し、*C. Elegans* と比較してヒト遺伝子との相同性も高く、多くの遺伝子解析が可能である。また疾患モデルとして頻用されるマウスと比較するとライフサイクルが 10 日間と短く、*GAL4/UAS* 標的発現システムを用いることにより組織特異的に標的遺伝子を過剰発現またはノックダウンさせることが可能である。従って目的とする神経系標的遺伝子の機能解析や、変異を有する疾患発症原因遺伝子による神経

系への影響を短期間で解析できる利点を有しており、京都工芸繊維大学山口らは神経変性疾患の病態解析モデルとして有用であることを示してきた(4,5)。ショウジョウバエには、*FUS* のホモログである *Cabeza* (以下 *Caz*) が存在し、*Caz* は *FUS* と同様に核に存在していて、RNA の代謝制御に重要な役割をしていると考えられている。*FUS* と同様に RNA の代謝制御に関係する *TDP-43* では、そのホモログである *TBPH* をノックダウンしたショウジョウバエで運動障害を生じることが報告されており(6)、本年我々は *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、*Caz* の機能喪失が運動能力の低下を来すことを報告した(7)。この *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエを用いて、*Caz* と遺伝学的に相互作用する因子の網羅的なスクリーニングを開始した。

B. 研究方法

1) *Caz* ノックダウンショウジョウバエ系統の作成

ヒト *FUS* に相同なショウジョウバエの *Caz* を RNAi によりノックダウンするため、*Caz* cDNA 断片を head to head で pRISE ベクターへクローニングした。Off-target 効果でないことを担保するために、2つの標的領域を target とする dsRNA を発現する transgene を使用した。target 領域は、*Caz* の aa.1-aa.167 と aa.363-aa.399 を標的としている。ベクターは自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター発生遺伝学研究部門の影山裕二先生より御供与頂いた pRISE ベクターを使用した。

2) *Caz* ノックダウンショウジョウバエの遺伝学的スクリーニング

①複眼原基特異的 *Caz* ノックダウンショウジョウバエの形態学的解析

組織特異的に標的遺伝子の発現を制御することが可能な GAL4-UAS システムを用いて、GMR-GAL4 ドライバー系統と *Caz* ノックダウン系統との交配により複眼原基特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエを作製し、その成虫複眼を走査型電子顕微鏡(KEYENCE VE7800)で観察し解析を行った。

②*Caz* ノックダウンと相互作用する分子の遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエは第1~4染色体を持ち、1~102の区画に分かれている。ショウジョウバエ遺伝資源センター(DGRC)には、それぞれの区画を狭めた約240種類以上の染色体欠失変異系統がストックされており、Deficiency Kits を入手し使用した。*Caz* を複眼原基特異的にノックダウンさせた系統と、染色体欠失変異系統をそれぞれ交配して次世代の複眼を観察し、*Caz* のノックダウンによる表現型を増強する系統あるいは抑圧する系統を探索した。観察は成虫複眼を走査型電子顕微鏡(KEYENCE VE7800)で解析した。

3) *Caz* ノックダウンと TBPH ノックダウンとの相互作用

Caz を複眼原基特異的にノックダウンさせた系統と、ヒト *TDP-43* のショウジョウバエホモログである *TBPH* のノックダウン系統を交配し、次世代の成虫複眼を走査型電子顕微鏡(KEYENCE VE7800)で比較解析した。

(倫理面への配慮)

本研究はヒト及びヒト由来の試料を対象としない。

C. 研究結果

1)複眼原基特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエの形態学的解析

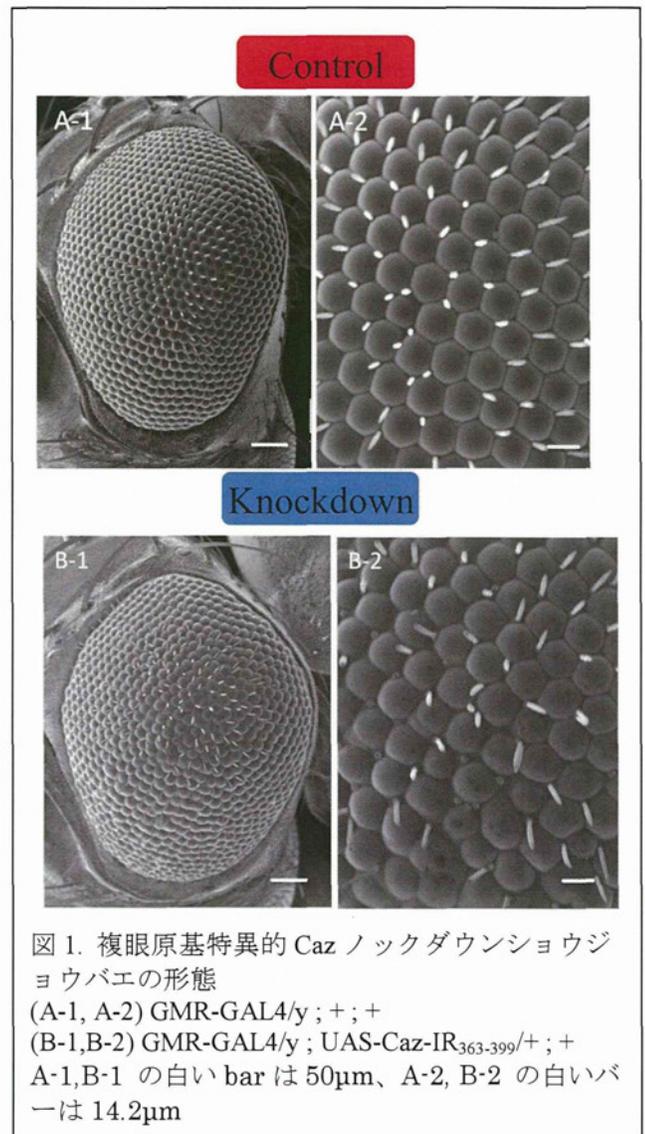
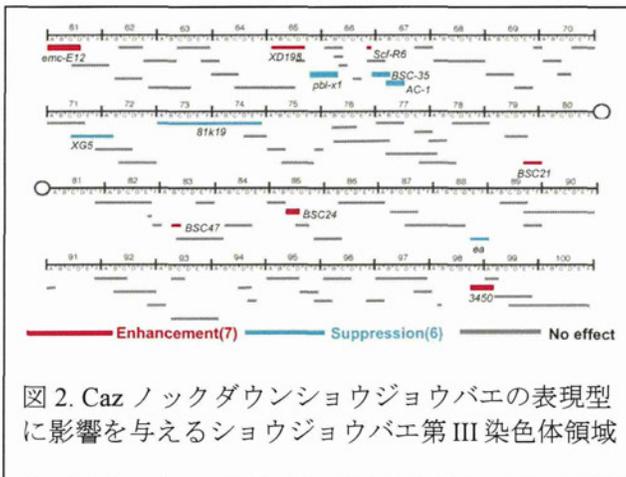


図1. 複眼原基特異的 *Caz* ノックダウンショウジョウバエの形態
 (A-1, A-2) GMR-GAL4/y ; + ; +
 (B-1, B-2) GMR-GAL4/y ; UAS-*Caz*-IR₃₆₃₋₃₉₉/+ ; +
 A-1, B-1 の白い bar は 50µm、A-2, B-2 の白いバーは 14.2µm

複眼原基特異的な *Caz* ノックダウンショウジョウバエ系統である *GMR;UAS-Caz-IR₃₆₃₋₃₉₉/+;+* を走査型電子顕微鏡で観察すると、一部に個眼の融合や剛毛の欠失などの *rough eye* 表現型を認めた。(図 1)。

2) 遺伝学的スクリーニング

Caz の複眼原基特異的なノックダウンによる表現型を指標として、ショウジョウバエの第III染色体欠失変異系統をそれぞれ交配させた結果、*Caz* ノックダウンによる表現型を増強する、あるいは抑圧するゲノム領域を同定した(図 2)。*Caz* ノックダウンによる *rough eye* の増強がみられた7か所のゲノム領域を赤線で示し、*rough eye* の抑圧が見られた6か所のゲノム領域を青線で示した。

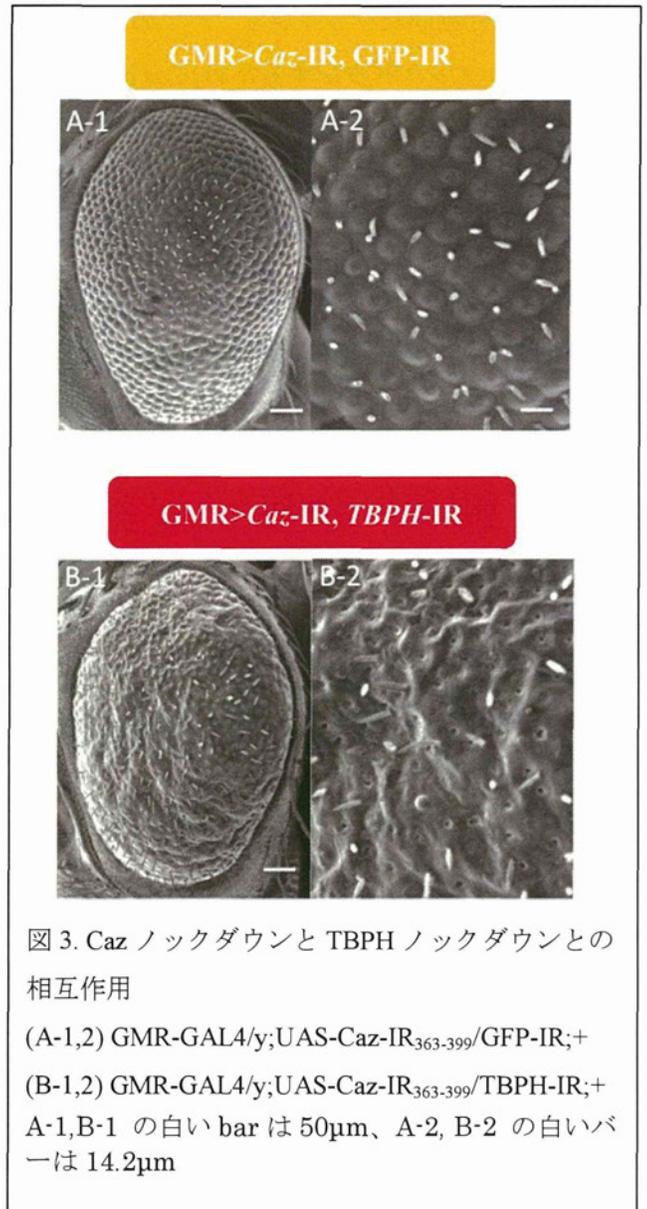


3) *Caz* ノックダウンと *TBPH* ノックダウンとの相互作用

Caz 単独の複眼原基特異的なノックダウンによる表現型に比べ、*Caz* と *TBPH* とをダブルノックダウンすることで、*rough eye* 表現型は相乗的な増悪を示した(図 3)。

D. 考察

FUS の遺伝子異常による ALS 病態発現機序が、変異によって異常凝集蛋白が細胞質への沈着することなどの *gain-of-function* 機序であるのか、あるいは正常な *FUS* 蛋白が細胞質にトラップされ



ることなどによって核内で機能すべき正常な *FUS* が失われるなどの *loss-of-function* 機序であるのかは未だ明らかではない。しかし、先行研究で、*FUS* と同様に RNA の代謝制御に関する *TDP-43* では、そのホモログである *TBPH* をノックダウンしたショウジョウバエで運動障害を生じることが報告されており(6)、我々も *FUS* のショウジョウバエホモログである *Caz* をノックダウンしたショウジョウバエ系統を樹立し、そのモデルショウジョウバエが運動障害を生じることを示した(7)。さらに、このモデルショウジョウバエを用いることにより、ショウジョウバエを用いた分子遺伝学

研究の最大の利点であるすでに確立された突然変異系ショウジョウバエとの交配による病態修飾分子の大規模なスクリーニングを開始することが可能になった。

Caz を複眼原基特異的にノックダウンすることで観察される rough eye 表現型（個眼の融合や剛毛の欠失など）を指標として、突然変異系統ショウジョウバエとの交配により、欠失すると *Caz* ノックダウンにより生じた表現型の抑圧が見られるゲノム領域を6ヶ所、増強が見られるゲノム領域を7ヶ所同定した。*Caz* ノックダウンによる異常を増強する突然変異系統ではその領域に *Caz* の機能発現に重要な遺伝子が存在し、抑圧する突然変異系統ではその領域に *Caz* ノックダウンによる異常を増悪させる遺伝子すなわち、その機能の抑制によって FUS-ALS の異常を緩和できる可能性のある遺伝子が存在すると考えられる。

このようにして同定したゲノム領域を、今後さらに狭めて相互作用する遺伝子を探索し、それらを神経系に発現させて運動能力、寿命、神経筋接合部などを比較する。また、*FUS* と同様に RNA の代謝制御に関係する *TDP-43* のショウジョウバエホモログである *TBPH* と *Caz* とをダブルノックダウンさせると表現型が悪化したことより、機能的類似性のある両者の相乗効果と考えられ、今後 ALS 関連遺伝子群との比較検討も有用であると考えられる。

Caz と相互作用する病態修飾分子のヒトホモログが同定できれば、疾患の新規診断マーカーや治療薬の新規標的分子となる可能性があると考えられる。

E. 結論

1) ショウジョウバエにおける *FUS* のホモログである *Caz* を複眼原基特異的にノックダウンすると、

一部に個眼の融合や剛毛の欠失など成虫複眼の形態異常 (rough eye 表現型) が見られた。

- 2) この rough eye 表現型を指標としてショウジョウバエ第III染色体欠失変異系統との交配を行い、欠失すると *Caz* のノックダウンによる表現型の抑圧が見られるゲノム領域を6ヶ所、増強が見られるゲノム領域を7ヶ所同定した。
- 3) 今後、*Caz* ノックダウンと他の染色体欠失変異系統との比較を行い相互作用する遺伝子を探索し、それらを神経系に発現させて運動能力、寿命、神経筋接合部などを比較する。また、ALS 関連遺伝子群との比較検討も行う。

文献

1. M. Neumann, et al. Science, 314: 130-133, 2006.
2. T.J. Kwiatkowski, et al. Science, 323: 1205-1208, 2009.
3. C. Vance, et al. Science, 323: 1208-1211, 2009.
4. N. Fujikake et al. J. Biol. Chem. 283: 26188-26197, 2008
5. R. Nagai et al. Exp cell res. 316:2313-2321, 2010
6. F. Feiguin, et al. FEBS Letters, 583: 1586-1592, 2009.
7. H. Sasayama, et al. Plos one, 7:e39483, 2012.

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Sasayama H, Shimamura M, Tokuda T, Azuma Y, Yoshida T, Mizuno T, Nakagawa M, Fujikake N, Nagai Y, Yamaguchi M. Knockdown of the *Drosophila* fused in sarcoma(FUS) homologue causes deficient locomotive behavior and shortening of motoneuron terminal branches. Plos one 7(6): e39483, 2012.

2.学会発表

- 1) 東裕美子, 笹山博司, 島村真依, 吉田誠克, 徳田隆彦, 水野俊樹, 中川正法, 山口政光:
ショウジョウバエ筋萎縮性側索硬化症モデルを用いた *FUS* 関連遺伝子群の探索 日本分子生物学会(第 35 回), 博多, 2012. 12. 12.

H.知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1.特許取得: なし
- 2.実用新案登録: なし
- 3.その他: なし

軸索イオンチャネル機能からみた ALS の病態

：チャネル調整剤の臨床試験に向けて

研究分担者 桑原 聡¹⁾

研究協力者 澁谷和幹¹⁾，三澤園子¹⁾，岩井雄太¹⁾

1) 千葉大学大学院医学研究院 神経内科学

研究要旨

現在我々は、Na チャネル阻害薬（塩酸 mexiletine）を用いて、筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する進行抑制効果を検討するランダム化群間比較臨床試験を行っている。ヒト孤発 ALS に対応する動物モデルはまだ開発されていないため、この試験はモデル動物を用いた基礎研究に基づくものではなく、ヒトを対象とした臨床研究データに基づいて行われている。これまでに ALS 患者では軸索持続性 Na 電流が増大していること、ALS ではこの電流が生理的に高い運動ニューロンが優位に障害されること、軸索 Na 電流は生存期間と関連することが示されており、この試験を行うに至った臨床研究データについて再考することで、この臨床試験の妥当性を検討した。

A. 研究目的

我々は、Na チャネル阻害薬（塩酸 mexiletine）の筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する進行抑制効果を検討するため、ランダム化群間比較臨床試験を 2011 年 12 月より 3 施設共同（千葉大学、東京都立神経病院、京都府立医科大学）で実施している。しかしこの試験は、ALS モデル動物を用いた基礎データに基づくものではない。

これまで、ALS の治療薬候補として様々な薬剤を用いた臨床試験が行われてきたが、その大多数は ALS モデル動物を対象としたデータに基づくものであった。しかし、2006 年に TDP-43 が Neumann, Arai らに報告されて以降 (Neumann et al., *Science* 2006, Arai et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2006)、唯一の動物モデルである SOD マウスの孤発性 ALS モデルとしての妥当性が疑問視されてきた (Mackenzie et al., *Ann Neurol* 2007)。

軸索イオンチャネルの観点から SOD マウスの軸索興奮性変化はヒト孤発性 ALS とは異なることが知られている (Boërio D et al., *Muscle Nerve* 2010, Moldvan et al., *Exp Neurol* 2011)。

そこで我々は、これまで得られた ALS 患者を対象とした軸索興奮性に関する知見を要約し、それを基に、ALS における塩酸 mexiletine 臨床試験の妥当性を検討した。

B. 研究方法

これまで得られた以下の臨床研究データについての再解析を行った。

- ① ALS 患者における軸索興奮性変化
- ② 軸索興奮性と運動神経細胞死（筋萎縮）の関係
- ③ ALS 患者における軸索興奮性と予後の関係
- ④ 塩酸 mexiletine の持続性 Na 電流抑制効果

*倫理面への配慮

本研究は千葉大学倫理委員会の承認を得ている。また個人情報保護に関しても細心の留意を行っている。

C. 研究結果

- ① ALS 運動軸索では持続性 Na 電流の増大や K 電流の低下が生じている (Kanai et al. *Brain* 2004, 2006, Tamura et al. *Clin Neurophysiol* 2007, Shibuya

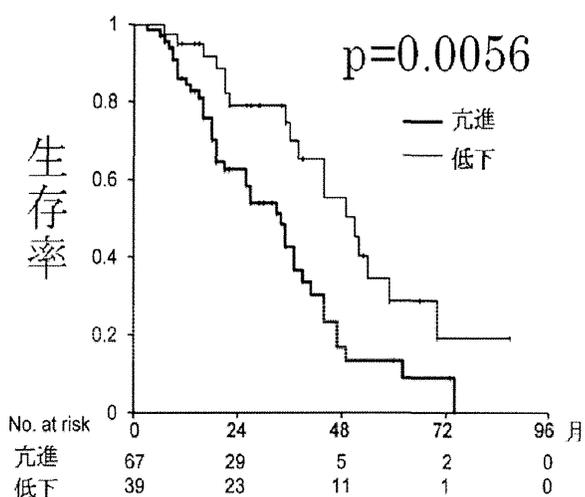
et al., *Exp Neurol* 2011)

ALS 患者 58 名、正常対照 25 名を対象とした研究で、ALS 患者では持続性 Na 電流が増大し K 電流が低下するという、軸索興奮性が増大する方向への変化が認められることが明らかとなった。また、この軸索興奮性変化が fasciulation や運動神経細胞死に結びついているのではないかと考えられた。②ALS では持続性 Na 電流が生理的に高い運動ニューロンが優位に障害される (Kuwabara et al. *Muscle Nerve* 2000, 2008)

ALS では母指球 (APB)・第一背側骨間筋 (FDI) が高度に萎縮するのに対し小指球 (ADM) が比較的保たれる解離性小手筋萎縮 (split hand) が特異的に認められる。また APB・FDI 支配の軸索では ADM 支配軸索よりも持続性 Na 電流が生理的に増大しており、ALS においてこの持続性 Na 電流差がさらに明確化していることを明らかにした。

③持続性 Na 電流のより増大した ALS 患者の生存期間は優位に短い (Kanai, Shibuya et al., *JNPN* 2012)

112 名の ALS 患者の、軸索興奮性検査の諸因子と生命予後の関係を検討した。多変量解析での結果は、持続性 Na 電流の増加は生存期間を規定する強力な因子であった。



図：持続性 Na 電流が亢進している ALS 患者は、低下している患者に比べ生存期間が短いという結果であった。中央生存期間は亢進群 34 カ月、

低下群 51 カ月であった。

これらの結果をふまえ、軸索興奮性が運動ニューロン死に関わっており、その中でも特に持続性 Na 電流が深く関わっている可能性を考えた。そこで、持続性 Na 電流の抑制が ALS 進行抑制をもたらす効果を検討するに至った。

④塩酸 mexiletine はヒト末梢神経 Nav1.6 を抑制する (Kuwabara et al. *Clin Neurophysiol* 2004) 筋痙攣を有する 20 名のニューロパチー患者において塩酸 mexiletine が持続性 Na 電流を抑制することを確認した。

この研究を基に、持続性 Na 電流の抑制薬として塩酸 mexiletine を候補とした。

D. 考察

以上の結果から、現時点でヒト孤発性 ALS 患者において塩酸 mexiletine を用いた介入試験を行うことは許容されると考えた。2011 年 12 月より、ランダム化群間比較試験が 3 施設共同試験 (千葉大学、東京都立神経病院、京都府立医科大学) として開始されている。60 例を 30 : 30 にランダム化し、評価項目を 6 カ月の観察期間における ALS-FRS スケールの変化・持続性 Na 電流の変化率等として進行中である。

E. 結論

ALS では運動ニューロン死に軸索興奮性に関わっている可能性があり、その中でも持続性 Na 電流が深く関わっている可能性がある。塩酸 mexiletine は持続性 Na 電流抑制作用を抑制する。これらの知見を基に、塩酸 mexiletine の ALS に対する進行抑制効果を検討する自主臨床試験を進行させている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Konno T, Shiga A, Tsujino A, Sugai A, Kato T, Kanai K, Yokoseki A, Eguchi H, Kuwabara S, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Japanese amyotrophic lateral sclerosis patients with GGGGCC hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Sep 25. [Epub ahead of print]
2. Kanai K, Shibuya K, Sato Y, Misawa S, Nasu S, Sekiguchi Y, Mitsuma S, Iose S, Fujimaki Y, Ohmori S, Koga S, Kuwabara S. Motor axonal excitability properties are strong predictors for survival in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Jul;83(7):734-8.
3. Uchida A, Sasaguri H, Kimura N, Tajiri M, Ohkubo T, Ono F, Sakaue F, Kanai K, Hirai T, Sano T, Shibuya K, Kobayashi M, Yamamoto M, Yokota S, Kubodera T, Tomori M, Sakaki K, Enomoto M, Hirai Y, Kumagai J, Yasutomi Y, Mochizuki H, Kuwabara S, Uchihara T, Mizusawa H, Yokota T. Non-human primate model of amyotrophic lateral sclerosis with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain*. 2012 Mar;135(Pt 3):833-46.
4. Eisen A, Kuwabara S. The split hand syndrome in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012 Apr;83(4):399-403.

2.学会発表

渋谷和幹、三澤園子、岩井雄太、他。筋萎縮性側索硬化症における split hand の病態機序：軸索興奮特性の観点から。第 53 回日本神経学会学術大会。2012 年、東京。

H.知的所有権の取得状況

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし

紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合における

エダラボンを用いた臨床研究

研究分担者 小久保康昌¹⁾

研究協力者 森本 悟²⁾，中川十夢³⁾，宮崎光一³⁾，葛原茂樹⁴⁾

1) 三重大学神経内科， 2) 健康長寿医療センター， 3) 町立南伊勢病院，

4) 鈴鹿医療科学大学

研究要旨

〔目的〕 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (ALS/PDC) では、病態に酸化ストレスの関与が想定されている。フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの臨床効果について報告する。

〔対象と方法〕 対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例（男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 68.4 歳、全例 PDC、平均罹病期間 9.4 年）に対するオープンラベル試験。方法は、エダラボン (1A, 30mg/回) を適量の生食液等で用時希釈し、30 分かけて 1 日 1 回点滴静注する。週 2 日間点滴投与を 1 クールとし、24 クールを連続して行う。(併用薬) ビタミン E (酢酸トコフェロール) 300mg/日とビタミン C (アスコルビン酸) 2000mg/日を連日内服併用する。開始時と終了時に MMSE、ALSFRS-R、UPDRS、FAB、やる気スコア、CAS を評価し効果を検討する。なお、本研究は、町立南伊勢病院倫理委員会で承認を得ている。

〔結果および考察〕 5 例中病状が軽度の 2 例で意欲や活動性に改善が見られた。特に最も病状の軽かった 1 例では、UPDRS、CAS やる気スコアであきらかな改善がみられた。他の 1 例では著変なく、高度認知症の残り 2 例では易怒性、暴力行為が出現し投与 3 ヶ月で中止した。

〔結論〕 牟婁病の病態に酸化ストレス、ニトロ化ストレスが関与しているという前提で、フリーラジカルスカベンジャーの投与研究を行った。病状が軽度の症例では、エダラボンが有効であった。

A. 研究目的

我々は、紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症/パーキンソン認知症複合 (ALS/PDC) では、尿中 OHdG が高値であることを報告しており (Morimoto et al. *Mov. Disord.* 2008)、病態に酸化ストレスの関与が想定されている。現在、common ALS において、エダラボンの臨床治験第Ⅲ相が行われており、診断確実で軽症例ではプラセボとの群間差をもってピンチ力が改善することが報告されている。紀伊 ALS/PDC におけるフリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンの臨床効果

について報告する。

B. 研究方法

対象は、紀伊 ALS/PDC 5 例（男性 4 名、女性 1 名、平均年齢 68.4 歳、全例 PDC、平均罹病期間 9.4 年）に対するオープンラベル試験。方法は、エダラボン (1A, 30mg/回) を適量の生食液等で用時希釈し、30 分かけて 1 日 1 回点滴静注する。週 2 日間点滴投与を 1 クールとし、24 クールを連続して行う。併用薬として ビタミン E (酢酸トコフェロール) 300mg/日とビタミン C (アスコルビン酸) 2000mg/日を連日内服併

用する。開始時と終了時に MMSE、ALSFRS-R、UPDRS、FAB、やる気スコア、CAS を評価し効果を検討する。期間は、2011年11月から2012年月まで。

(倫理面への配慮) 本研究は、町立南伊勢病院倫理委員会で承認を得ている。

表 1 対象患者

	Pheno type	Age	Sex	Duration of illness (years)	MMSE	Yahr
1	PDC	72	F	11	5/8 (mute)	IV
2	PDC	69	M	2	27/30	II
3	PDC	56	M	10	8/30	IV
4	PDC	73	M	8	12/30	V
5	PDC	72	M	16	0/30	V

C. 研究結果

5例中病状が軽度の2例で意欲や活動性に改善が見られた。特に最も病状の軽かった1例では、UPDRS、CAS やる気スコアであきらかな改善がみられた。他の1例では著変なく、高度認知症の残り2例では易怒性、暴力行為が出現し投与3ヵ月で中止した。

表 2 MMSE

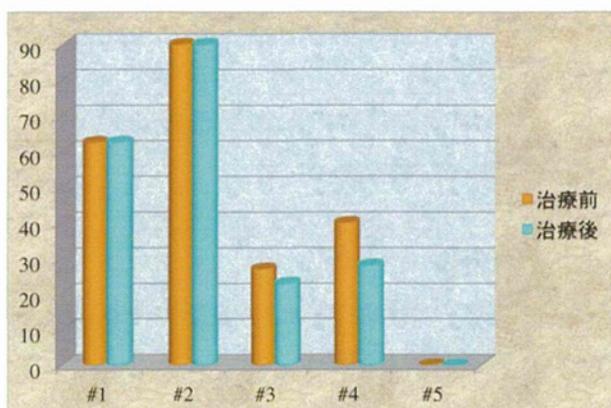


表 3 FAB

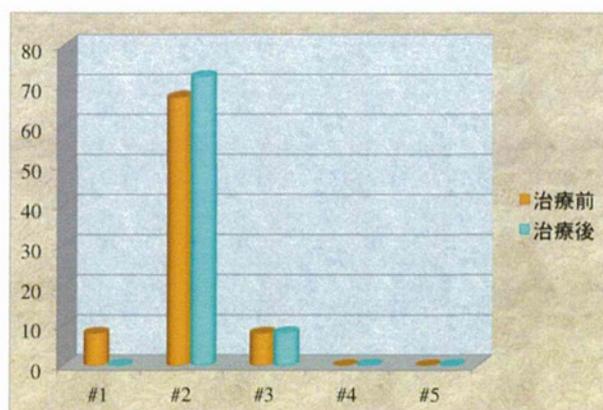


表 4 やる気スコア

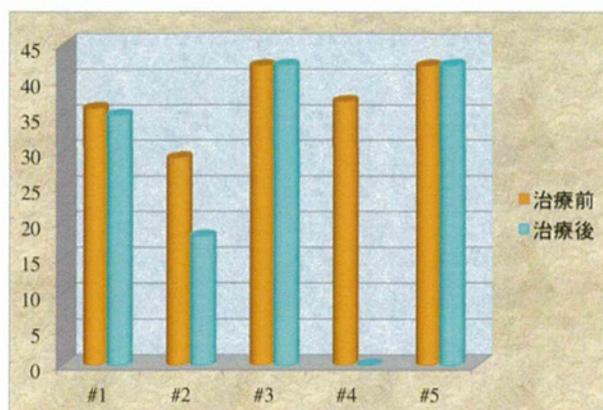


表 5 CAS:面接

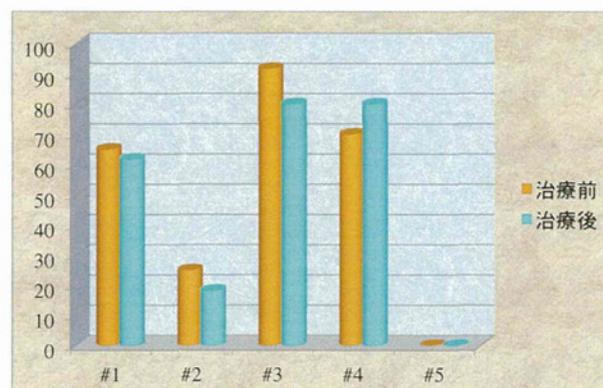


表6 CAS: 質問紙

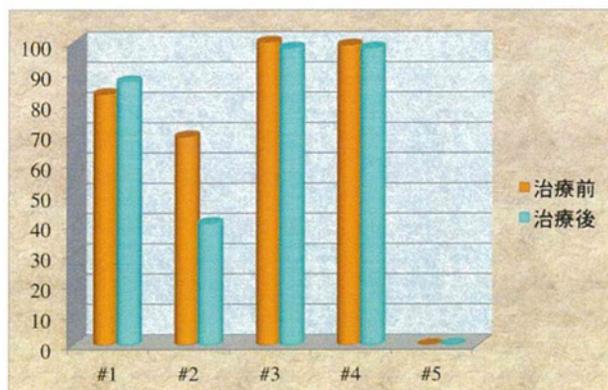


表7 CAS: 日常生活行動

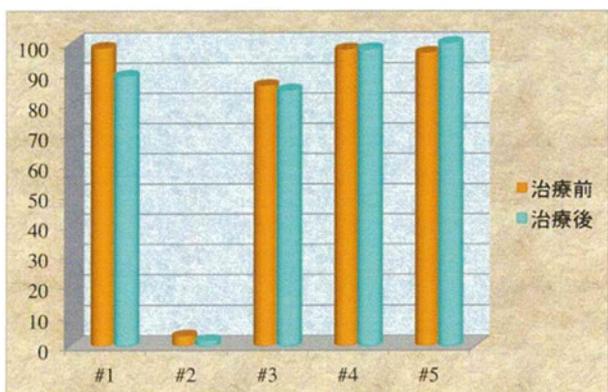
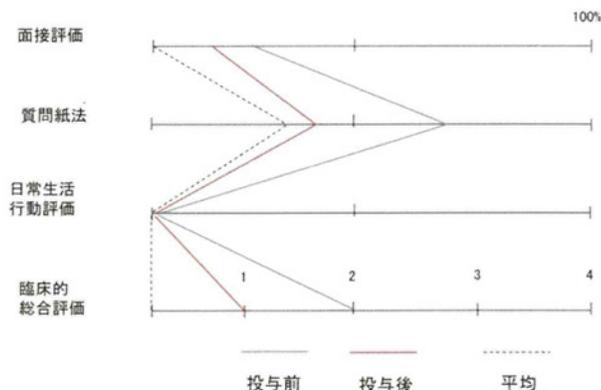


表8 やる気スコア：自由時間観察

Yahr		
1	IV	自つきがしっかりした、自分で食事を食べる、立ち上がろうとする、掃除をしようとする、会話が聞きやすい、ほとんどmuteだが、ありがとうという発語あり、昼夜のメリハリ
2	II	犬の散歩が長くなった、家の補修を2時間した、歩くのが速くなった、意欲が出た、動きやすい、走れるような気がする
3	IV	不変
4	V	易怒性、暴力、昼夜逆転
5	V	自分で食事をしなくなった、易怒性、暴力、性的逸脱

表9 症例2: CAS



D. 考察

エダラボンは、神経疾患に対しては脳梗塞とALSのほかには投与されたデータはない。今回、紀伊 ALS/PDC の、とくに意欲低下を主体とする認知症症状に対する効果について注目した。症例2で歩行や動作、意欲の改善、症例1で発語量の増加や受け答えの改善と言った反応が見られた。症例3は不変、症例4,5は、易怒性、性的逸脱等があり投与、約3ヵ月で中止した。少数例での検討ではあるが、比較的軽症の患者ではある程度の効果が期待できる可能性がある。

E. 結論

牟婁病の病態に酸化ストレス、ニトロ化ストレスが関与しているという前提で、フリーラジカルスカベンジャーの臨床研究を行った。病状が軽度の症例では、エダラボンが有効であった。今後、多数例での長期的な進展予防効果等についての検討が必要である。

F. 健康危険情報

進行例で高度の認知症例では、易怒性や性的逸脱といった興奮症状を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kokubo Y, Taniguchi A, Hasegawa M, Hayakawa Y, Morimoto S, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Saito Y, Murayama S, Kuzuhara S. α -Synuclein Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula, Japan. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71:625-30.

2. Kokubo Y, Nomura Y, Morimoto S, Kuzuhara S. Cardiac (123)I-meta-iodobenzylguanidine scintigraphy in patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Parkinsonism and Related Disorders* 18 (2012) 306-308

3. Naruse H, Takahashi Y, Kihira T, Yoshida S, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ishiura H, Amagasa M, Murayama S, Tsuji S, Goto J. Mutational analysis of familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis with OPTN mutations in Japanese population. *Amyotroph Lateral Scler.* 13:562-566, 2012

4. Tameko Kihira, S Yoshida, T Kondo, K Iwai, S Wada, S Morinaga, Y Kazimoto, T Kondo, K Okamoto, Y Kokubo, S Kuzuhara. An increase in ALS incidence on the Kii Peninsula, 1960-2009: A possible link to change in drinking water source. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, 2012; 13: 347-350

5. Kuzuhara S, Kokubo Y. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism Dementia Complex in the Kii Peninsula of Japan (Muro disease): a review w on recent research and new concept. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and the frontotemporal dementias.* Oxford University Press, Ed. By Michael J. Strong 2012, pp39-54.

2.学会発表

1. Shigeki Kuzuhara、 Yasumasa Kokubo. Changing patterns of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parkinsonism-dementia complex (PDC) of the Kii peninsula in Japan. 13th Asian Oceanian Congress of Neurology.2012.6.4-8. Melbourne, Australia

2. Satoru Morimoto, Yasumasa Kokubo,

Masato Hasegawa, Shigeki Kuzuhara, Shigeo Murayama. Immunochemical Study Western blotting of tauopathy in ALS/ Parkinson Dementia Complex (PDC), Kii, Japan. AANP.2012.6.21-24. Chicago, USA

3. Yasumasa Kokubo, Akira Taniguchi, Masato Hasegawa, Yuma Hayakawa, Satoru Morimoto, Misao Yoneda, Yoshihumi Hirokawa, Taizo Shiraishi, Yuko Saito, Shigeo Murayama, Shigeki Kuzuhara. Alfa-Synuclein pathology of amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex in the Kii Peninsula, Japan. The 8th International Conference on Frontotemporal dementias, Manchester, UK, 2012.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし

転写を標的とした家族性筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発

研究分担者 高橋良輔¹⁾

研究協力者 村上 学¹⁾、井上治久²⁾、月田香代子²⁾、浅井康行³⁾、天貝裕地⁴⁾、
饗庭一博⁵⁾、伊東秀文⁶⁾、上杉志成^{5), 7)}、中辻憲夫^{5), 8)}

1) 京都大学大学院医学研究科臨床神経学, 2) 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA),
3) (株) リプロセル, 4) 幹細胞創薬研究所, 5) 京都大学物質一細胞統合システム拠点,
6) 和歌山県立医科大学神経内科, 7) 京都大学化学研究所, 8) 京都大学再生医科学研究所

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) のうち約 10% を占める家族性 ALS の主要な原因遺伝子である superoxide dismutase 1 (SOD1) は、変異 SOD1 蛋白が毒性を獲得することにより運動ニューロン変性を来す。我々は、SOD1 転写活性を抑制する低分子化合物を同定するためのハイスループット・アッセイ系を確立した。このスクリーニング・システムを用いたさらなる解析により、2つのヒット化合物が濃度依存的に、細胞毒性を示すことなく、特異的かつ部分的に SOD1 の発現を抑制することを見出した。その特徴的な化学構造を共通して持つ、FDA に承認されている既存薬 X が、変異 SOD1G93A トランスジェニックマウスから採取したプライマリ・アストロサイトの SOD1 の発現も抑制することを見出した。さらに、既存薬 X を変異 SOD1G93A トランスジェニックマウスに経口投与して、既存薬 X の、運動ニューロン疾患に対する *in vivo* での効果を解析した。既存薬 X はマウスの脊髄内 SOD1 発現量を減少させ、腰髄神経前根及び前角細胞の変性を抑制し、神経炎症を抑制することを見出した。さらに、変異 SOD1 マウスの運動ニューロン疾患症状の進行を遅延し、生存日数を延長することを見出した。本研究から、我々のスクリーニング・システムが SOD1 関連家族性 ALS の治療薬開発に強力な手段となりうると考えられる。また、病原蛋白の発現を直接抑制するという治療戦略は、変異蛋白の蓄積によって生ずる他の神経変性疾患にも適用可能であると考えられる。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、上位及び下位運動ニューロンが選択的に変性する致死的な神経変性疾患である。ALS では進行性の筋力低下、麻痺を生じ、発症より 5 年以内に呼吸不全に至る。全 ALS の約 10% を占める家族性 ALS の内、約 25% は superoxide dismutase 1 (SOD1) 遺伝子変異によるものである。

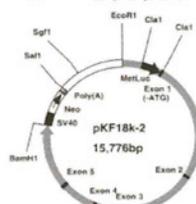
変異 SOD1 蛋白が獲得した神経毒性が増強することにより、ALS を発症すると考えられる。変異 SOD1 蛋白の発現レベルが、運動ニューロン疾患の進行や重篤度を規定することが種々の先行研究で示唆されている。従って SOD1 蛋白の発現を抑制することは SOD1 関連家族性 ALS に治療効果を有すると考えられる。そこで我々は、SOD1 の転写活性を抑制する化合物を同定するためハイスループット・スクリーニング (HTS) 系を確立したことを報告した。

本研究で我々は、既に臨床で使用されている既存薬 X が SOD1 の転写を抑制することを見出し、変異 SOD1 トランスジェニックマウス由来アストロサイトでも SOD1 蛋白発現抑制作用を示した。さらに、

主要な ALS モデルの一つである変異 SOD1 トランスジェニックマウスに投与することで、治療効果を有することを見出した。既存の分子標的薬を用いたことによって、治験までの過程を大幅に短縮できる可能性がある。

B. 研究方法

(a) SOD1 プロモータ下にルシフェラーゼ・レポーターを発現する細胞株の作製



5' 及び 3' 非翻訳領域を含む、ヒト SOD1 のゲノム・プロモータを用いた。SOD1G93A トランスジェニックマウスのもと同じ (gPrSOD1-Luc) で、SOD1 プロモータの生理活性を反映する。

H4 細胞株は 37°C で、DMEM (10% FBS, penicillin/streptomycin, G418 加) 培養した。SgfI で切断、FuGENE 6 Transfection Reagent でトランスフェクションし、恒常的に発現する株をクローニングした。サザン・ブロットィング、ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイで選別した。

(b) 使用化合物ライブラリ

gPrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を用いた HTS アッセイを行い、京都大学化学研究所から供与された 9,600 化合物をスクリーニングした。

(c) HTS アッセイ

gPrSOD1-ルシフェラーゼ細胞株を種々の化合物で処理し 96 ウェルプレートでルシフェラーゼ活性を検出した。細胞は overnight 前培養後最終濃度 40 μ M で処理しさらに 16 時間培養した。Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter System で分泌ルシフェラーゼ活性を測定した。vehicle 処理群との比で信号の自然減衰を補正した。アッセイ精度は Z factor (Z') で評価した。化合物のヒット選別条件は、陰性対照の平均値 - 3SD を下回る場合とした。 Z' 値が 0 未満の試行は選別から外した。さらに 2 回アッセイを行った。

(d) 濃度依存性試験及び細胞毒性試験

細胞を overnight で前培養し化合物添加培地に交換し濃度を振った。さらに 16 時間培養しルシフェラーゼ活性を測定した。40 μ M で -3SD 以上の SOD1 発現抑制作用を有するもののみ解析した。

H4 細胞で WST-1 アッセイを行いルシフェラーゼ活性を非特異的に減弱させる化合物を除外した。overnight 前培養、化合物添加培地に交換し 0-40 μ M に濃度を振りさらに 16 時間培養し WST-1 を 10 μ L/well 加え 1 時間培養し 450nm 吸光度を測定した。40 μ M で蛍光が非治療細胞に比べ -2SD 以上減弱した場合有意な細胞毒性と判断した。

(e) ELISA アッセイ

ELISA とウェスタンブロットティングで内因性 SOD1 蛋白レベルを判定した。H4 細胞を overnight 前培養、ヒット化合物添加培地に交換し 48 時間培養し PBS 洗浄しプロテアーゼ阻害剤加 1% Triton-X 液で細胞溶解した。抗体を用いたサンドイッチ法によるヒト SOD1-ELISA を行った。EIA 用 96 ウェルアッセイプレートを rabbit anti-SOD1 antibody でコーティングした。4°C overnight 後、PBS 洗浄し 3%ウシ血清アルブミン (BSA) 液でブロッキングした。細胞溶解液を加えた。overnight 4°C 後 PBS 洗浄し mouse anti-SOD1 antibody を加え 1 時間室温でインキュベート、PBS 洗浄後 HRP-goat anti-mouse IgG antibody で検出した。1 時間室温でインキュベートし基質を反応させた。1M リン酸 Na で反応停止後 450nm 吸光度変化比を測定した。細胞溶解液中の SOD1 濃度は検量線の 1.0-125 ng/mL 間の直線変化域で算出した。細胞溶解液は SDS-PAGE を行い、PVDF membranes にトランスファーした。3% BSA 液でブロッキングし anti-SOD1 antibody でプローブ、次に anti- β -actin antibody で再プローブした。

(f) 定量的リアル・タイム RT-PCR

LightCycler SYBR green I を用いて、LightCycler 480 sequence detection system で行った。総 RNA の抽出は TriPure Isolation Reagent を用いた。標的 mRNA の相対量は β -actin の mRNA で補正した。

(g) ウェスタン・ブロットティング

プロテアーゼ阻害剤及びフォスファターゼ阻

害剤加 1% Triton-X 液で細胞を溶解した SDS-PAGE、PVDF membranes にトランスファー、3% BSA 液でブロッキングした。anti-SOD1 antibody、次に anti- β -actin antibody でプローブした。

(h) NF- κ B 活性測定ルシフェラーゼ・アッセイ

H4 細胞を overnight 前培養し 48 時間後、FuGene 6 Reagent で NF- κ B reporter plasmid ((Ig κ)3 conaluc plasmid) をトランスフェクションした。ルシフェラーゼ活性は Drug X で処理して 4 時間後、Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて測定した。

(i) 行動解析及び SOD1G93A マウスの発症と生存日数の観察

雄のヒト SOD1G93A 遺伝子トランスジェニックマウスを野生型の雌と交雑した。マウスに既存薬 X を経口ゾンデで投与した。投与期間は 26 週齢から 32 週齢の 6 週間投与した。マウスの生存を毎日評価し、週に 2 回体重測定及び ALS grading scale の評価を、薬剤投与グループとは異なる施行者が盲目的に行った。投与開始時の体重のピーク時を onset、10%の減少を認めた時点を Early disease と定義した。End-stage はマウスを側臥位にして 30 秒以内に体勢を直すことができなくなることを観察した時期と定義した。

(j) SOD1G93A マウス脊髄内 SOD1 発現の解析

マウスは腹腔内麻酔で麻酔し、脱血還流した。組織は 1% Triton-X 100 を含む溶解液でホモジナイズした。5 μ g の脊髄から採取した蛋白を入れ、SDS-PAGE を行い、PVDF membranes にトランスファー、3% BSA 液でブロッキングした。

(k) 組織解析

マウスは PBS で還流した後、4% buffered paraformaldehyde で固定した。脊髄は同じ溶液で後固定した。腰髄膨大部を取り出し、パラフィン包埋、6 μ m の厚さで連続切片を作成した。

(m) 統計

定量解析は one way-ANOVA もしくは Students t-test で行った。生存分析は Long-rank test で行った。ソフトウェアは Prism 5 を使用した。(倫理面への配慮)

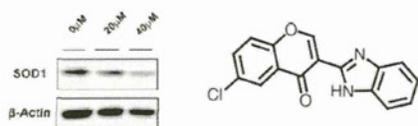
京都大学医学部倫理委員会に承認を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守する。動物の取扱については、医学部動物実験ガイドラインを遵守し動物委員会の承認を得て行う。

C. 研究結果

(a) HTS アッセイ

ルシフェラーゼ活性とサザン・ブロットティングの結果より、gPrSOD1-Luc を恒常的に発現するクローンを選別しスクリーニングに使用した。 Z' 値の平均値は 0.39 (range, -0.04-0.75) であった。SOD1 の転写を有意に抑制しうるヒット化合物を 120 種類同定した。濃度依存性反応の乏しい化合物は除外した。WST-1 アッセイにより非特異的細胞毒性を有すると考え除外した化合物は 5 種類あった。ELISA にて、残り 115 化合物の内、2 種類が内因性 SOD1 蛋白レベルを濃度依存的に低下させた。ELISA で有意な SOD1 蛋白レベルの低下を認めない化合物は採用しなかった。レポーター・ア

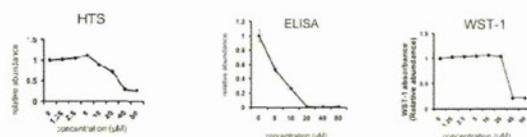
ッセイ及び ELISA で SOD1 の発現抑制効果を解析した。2 化合物の内、EC50 が良好な 1 化合物 052C9 (下右図) をウェスタン・ブロッティングにてさらに検証した。H4 細胞において、 β -アクチンの発現を低下させることなく、内因性 SOD1 蛋白レベルを有意に低下させた (下左図)。



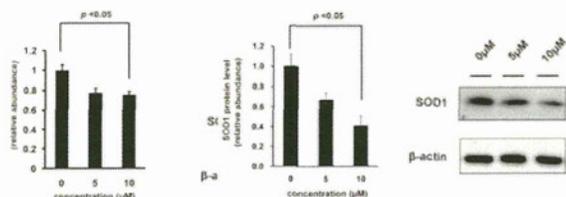
(b) 既存薬 X は H4 細胞の SOD1 転写を抑制する

他の 2 化合物が共通の特徴的な化学構造を有し、同様の構造を持つ既存薬 X も SOD1 プロモータ活性を抑制するか検討した。既存薬 X は SOD1 プロモータ活性を低下させた (下左図)。

ELISA の結果、既存薬 X は細胞毒性を認める濃度より低濃度で内因性 SOD1 蛋白発現レベルを H4 細胞において低下させた (下左右図)。

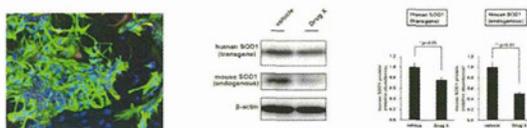


次に定量的リアル・タイム RT-PCR 及びウェスタン・ブロッティングによる解析、既存薬 X が SOD1 の蛋白レベル (下右中図)、mRNA レベル (下左図) でも発現を低下することを認めた。



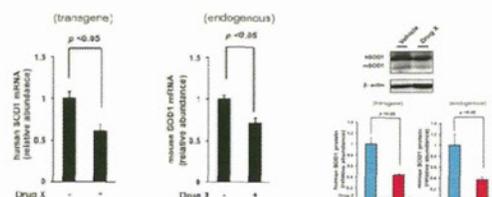
(c) 既存薬 X は変異 SOD1 導入マウス由来プライマリ・アストロサイトの SOD1 発現も低下させる

我々は変異 SOD1 導入マウスからプライマリ・アストロサイトを採取し (下左図) 既存薬 X が SOD1 発現を抑制することを認めた (下右図)。



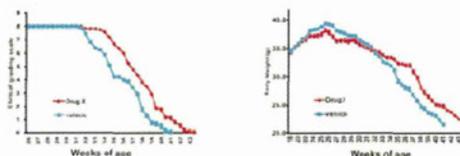
(d) 既存薬 X は SOD1G93A 導入マウスの脊髄内 SOD1 発現を低下させる

SOD1G93A マウスに 4 週間既存薬 X を経口投与した。既存薬 X はマウス脊髄内 SOD1 の mRNA レベルは有意に低下していた (下左中図)。既存薬 X をより長期間経口投与 (6 週間) し蛋白レベルも有意に減少させた (下右図)。

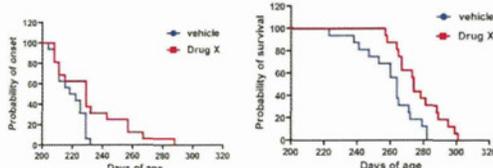


(e) 既存薬 X は SOD1G93A トランスジェニックマウスに投与すると ALS 症状を改善する

SOD1G93A 低コピーマウスに 26 週齢 (マウスの体重増加がほぼ完了=発症) より既存薬 X (30mg/kg) を毎日ゾンデによる経口投与を行った。既存薬治療群マウス (n=16) 及び vehicle 投与群マウス (n=16) をモニターし毎日生存の有無を確認し 1 週間に 2 回体重と ALS 症状スコアを観察した。既存薬 X 治療群は有意に ALS 症状スコアの悪化を遅延し (下左図) 体重減少も遅延した (下右図)。

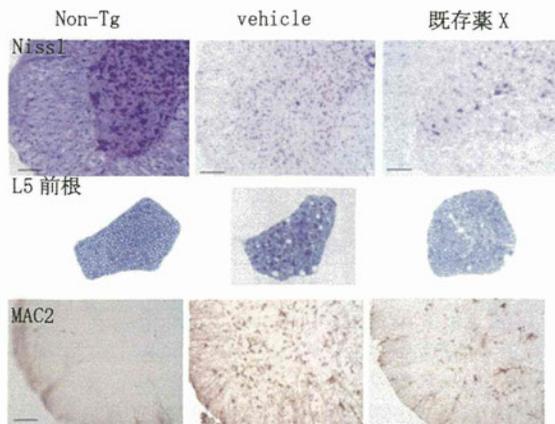


SOD1 マウスの Early disease までの期間を 14 日間延長した (既存薬 X 治療群, 233 ± 6 days, vehicle 治療群 219 ± 2 days; log rank, $\chi^2=5.0$, $P<0.05$) (下左図)。さらに既存薬 X は SOD1 マウスの生存日数を 16 日間延長した (既存薬 X 治療群, 276 ± 3 days, vehicle 治療群, 260 ± 4 days; log rank, $\chi^2=7.1$, $P<0.01$) (下右図)。



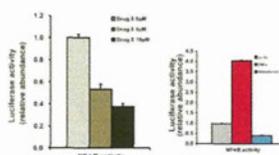
(e) 既存薬 X は運動ニューロン変性を抑制する

腰髄 L5 神経根のトルイジン・ブルー染色及び腰髄膨大部の Nissl 染色にて脊髄前角細胞の変性を抑制することを観察した (下図)。



(f) 既存薬 X は神経炎症、NF- κ B を抑制する

既存薬 X は MAC2 陽性活性型ミクログリアの増生を抑制した (上図)。NF- κ B は神経炎症の主要な転写因子で SOD1 転写調節因子の一つでもある。NF- κ B レポーターアッセイ ((Ig κ)3 conaluc) で既存薬 X が NF- κ B の活性を低下した (下図)。



D. 考察

我々は SOD1 の転写をターゲットとしたスクリーニングを、アストロサイト由来 H4 細胞株を用いて確立しヒット化合物の同定に成功した。052C9 は濃度依存的に有意に SOD1 蛋白レベルを低下させた。SOD1 発現低下を認める濃度では細胞毒性は検出されず β -actin 発現レベルも低下しないため転写を全般的に抑制しないと考えられる。

既存薬 X は SOD1 の発現を部分的に抑制する。SOD1 発現抑制は部分的であることが望ましい可能性がある。SOD1-KO マウスは ALS 表現型を示さないが軸索切断に対する軽度の脆弱性を認め、病理学的に神経筋接合部及び軸索の変性を認める。

低分子化合物で野生型 SOD1 の発現を低下させることは、SOD1-ALS だけでなく孤発性 ALS にも効果を有し得る。野生型 SOD1 マウスも変異 SOD1 マウス同様の病理変化を認め、野生型と変異型 SOD1 の同時導入マウスで表現型が増悪する。

SOD1 プロモータの変異により SOD1 遺伝子発現レベルが低下し孤発性 ALS 患者の発症遅延との関連が示唆される。活性化プロテイン C を変異 SOD1 マウスに投与すると SOD1 発現を抑制し ALS の表現型を緩和させた。これらの知見に基づくと、変異 SOD1 の毒性とは「新規毒性の獲得」というよりは「野生型 SOD1 の毒性の増強」によるものかもしれない。病原蛋白の転写を直接抑制することは、SOD1 関連家族性 ALS の新規治療戦略のみならず病原蛋白が蓄積する他の神経変性疾患にも応用可能と考えられる。

我々のスクリーニング・システムは SOD1 転写を抑制する既存薬 X を同定した。既存薬 X を変異 SOD1 マウスに経口投与し ALS 症状を改善した。既存薬 X の SOD1 転写抑制効果は *in vitro* 及び *in vivo* で mRNA、蛋白レベルともに効果を認めた。既存薬 X は国内で既に抗癌剤として使用され安全性も受け入れられている。本研究は既存薬 X の新たな薬理的性質を提示し ALS 治療薬として新たに再配置できる可能性を示すものである。

既存薬 X が神経炎症及び NF κ B の活性を低下させることが示された。NF κ B は神経炎症に関わる主要な転写因子で ALS 患者の脊髄前角で発現が亢進する。NF κ B の転写調節領域が、SOD1 の 5' 非翻訳領域にあるプロモータ領域に存在しており、NF κ B が SOD1 の転写調節因子の一つという報告もある。既存薬 X の SOD1 発現調節作用機序の少なくとも一部は NF κ B を介する可能性が示唆される。

我々はどの細胞種で既存薬 X が SOD1 発現抑制効果を最も認めるかは同定できなかったが、変異 SOD1 マウス由来プライマリ・アストロサイトを用いることで少なくとも SOD1 発現抑制作用を有することが示唆された。実際本研究では既存薬 X の発症後投与により SOD1 マウスの発症進行が延長しているが、ニューロンやミクログリア等他の細胞に対し効果を有する可能性はあると思われる。

既存薬 X の効果は細胞をベースにした実験で見られる SOD1 発現抑制効果に比べると SOD1 マウスの ALS 症状に対する治療効果は限定的である。この差異は、脳血液関門を通過する程度が低いことに起因するのかもしれない。今後既存薬 X をリー

ド化合物として、より有効で脳血液関門を通過しやすい薬剤に改良することが望まれる。

神経変性疾患の特徴は、病原蛋白が蓄積すること、その蛋白が毒性を獲得しその毒性により神経変性が生ずることである。本研究の成果は、SOD1 関連 ALS のような神経変性疾患に対し、マウスモデルと患者 iPS 細胞由来の疾患標的細胞の両者を用いて、病原蛋白の発現を直接薬剤で調節するという新しい治療戦略の可能性を示すものである。

E. 結論

ALS モデルマウスにおいて、病原蛋白 SOD1 発現を抑制し、病理学的解析及び表現型解析において治療効果を有する既存薬の分子標的薬を同定した。この薬剤は NF κ B 経路を抑制し、孤発性 ALS に対して有効性を発揮する可能性が示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

・村上 学、井上治久、月田香代子、伊東秀文、浅井康行、天貝裕地、饗庭一博、下川浩輝、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔：既存薬による SOD1 転写を標的とした筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発。第 53 回日本神経学会学術大会，東京（2012. 5. 25）

・Murakami G., Inoue H., Tsukita K., Asai Y., Amagai Y., Aiba K., Shimogawa H., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R. : Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 13th Asian Oceanian Congress of Neurology, Melbourne, Australia(2012. 6. 4-8)

・村上 学、井上治久、月田香代子、伊東秀文、浅井康行、天貝裕地、饗庭一博、下川浩輝、上杉志成、中辻憲夫、高橋良輔：既存薬による SOD1 転写を標的とした筋萎縮性側索硬化症新規治療法の開発。第 21 回日本 Cell Death 学会，名古屋（2012. 7. 28）

・Murakami G., Inoue H., Tsukita K., Asai Y., Amagai Y., Aiba K., Shimogawa H., Uesugi M., Nakatsuji N., Takahashi R. : Chemical library screening identifies a small molecule that downregulates SOD1 transcription for drugs to treat amyotrophic lateral sclerosis. The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Nagoya, Japan(2012. 9. 19)

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

骨髄間葉系幹細胞と人工染色体による複数神経栄養因子の中枢神経デリバリー

研究分担者 中島健二¹⁾

研究協力者 渡辺保裕¹⁾, 山川三穂¹⁾, 河瀬真也¹⁾, 恵比木満喬¹⁾, 安井建一¹⁾,
北山通朗¹⁾, 中野俊也¹⁾

1) 鳥取大学医学部医学科脳神経医科学講座 脳神経内科学分野

研究要旨

【目的】ヒト人工染色体(HAC)技術を用いて、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、インスリン様成長因子(IGF-1)、肝細胞増殖因子(HGF)を同時発現する骨髄間葉系幹細胞(MSC)を樹立し、筋萎縮性側索硬化症(ALS)モデルマウスへの移植効果を検討する。

【方法】(1)P1由来人工染色体(PAC)にGDNF, IGF-1, HGFに加え、ルシフェラーゼの遺伝子を導入する。(2)Chinese hamster ovary (CHO)細胞内でCre-loxP部位特異的組換えによりPAC上の目的遺伝子群をGFPが搭載されたHAC上へ搭載する。(3)微小核細胞融合(MMCT)法によりCHO細胞からMSCにHACを移入する。(4)得られたHAC導入MSCを筋萎縮性側索硬化症モデルマウス(60, 80, 100日齢)の第四脳室から脊髄へ移植し、臨床効果を観察する。

【結果】GDNF, IGF-1, HGFのELISA, ルシフェラーゼ活性, GFPの発現解析等による検討の結果、導入遺伝子がコードする蛋白質をいずれも高発現しているHAC導入MSCクローンを得た。100日齢での移植においてALSマウスに対する寿命延長効果を確認した。

【結論】GDNF, IGF-1, HGFを高発現するMSC株を樹立し、ALSマウスに対する有効性を確認した。

A. 研究目的

細胞移植治療に遺伝子(神経栄養因子)治療を組み合わせることで、細胞移植治療の効果の増強を図る。人工染色体(HAC)技術を用いて、グリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)、インスリン様成長因子(IGF-1)、肝細胞増殖因子(HGF)を同時発現する骨髄間葉系幹細胞(MSC)を樹立する。樹立した細胞株を用いてALSモデルマウスに対する治療効果を検討する。

B. 研究方法

(1)P1由来人工染色体(PAC)にGDNF, IGF-1, HGFに加え標識蛋白(GFP, ルシフェラーゼ)のcDNAを導入する(図1A)。(2)微小核細胞融合(MMCT)法によりHACベクターを搭載したChinese hamster ovary (CHO)細胞にインサートを含むPACを導入する(図1B)。(3)Cre-loxP部位特異的組換えにより目的のインサートを含むCHO細胞クローンを得る。(4)MMCT法によりCHOクローンからヒト不死化MSCにHACを転移させる(図1B)。(5)得られたHAC導入MSC細胞株を解析する。(6)最も適した細胞株を用いてSOD1^{G93A}モデルマウスの髄腔内に60日, 80日, 100日齢で移植(図2)し臨床効果検討をおこなう。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験, 動物実験および動物の取り扱いに関しては、鳥取大学の当該委員会での承認を得てこれを遵守して行った。

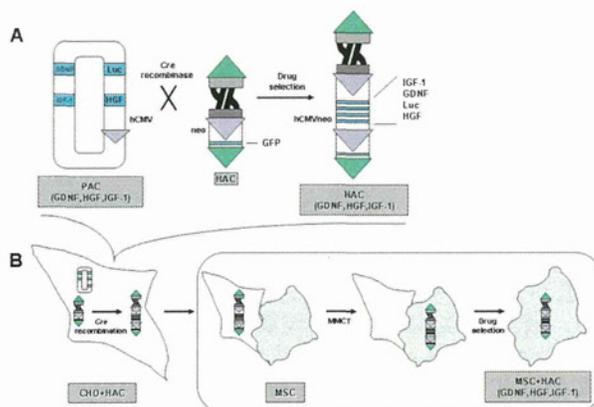


図1A 栄養因子のHACへの導入

Chinese hamster ovary (CHO)細胞内で、GDNF, HGF, IGF-1をP1由来人工染色体(PAC)からHACへCre-loxP部位特異的相同組換えをする。

図1B 栄養因子を含むHACを搭載したMSCの作製

微小核細胞融合(MMCT)法によりCHOクローンからMSCにHACを転移させる(MSC細胞内でのPACからHACへの相同組換えは技術的に不可能なため、CHO細胞を介在する必要がある)。

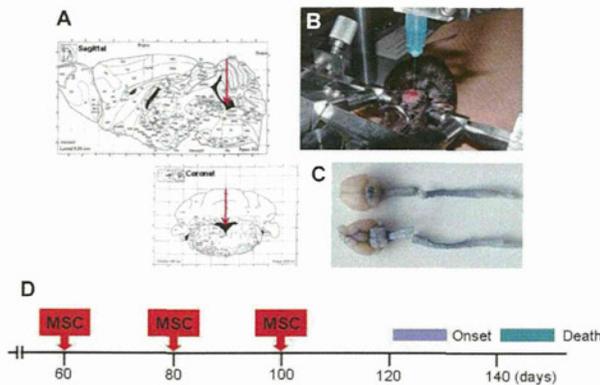


図2 マウス定位脳手術

マウス解剖アトラス、マウス矢状断、赤矢印の経路で第四脳室へ注射針を挿入する(A)。同手技で青色色素を注入すると第四脳室へ注入した色素は脊髄表面に広く分布した(B)。定位脳手術にて第四脳室へ細胞を注入する(C)。マウス日齢60, 80, 100日に移植を実施する(D)。

C. 研究結果

解析した41のCHOクローン中13クローンでPAC由来インサートの全長が保持されていた。うち2クローンで全てのインサート領域はCHO染色体上ではなくHAC上に存在した。CHO細胞クローンからMSCへのMMCTにて、46クローン中30クローンでPAC由来のインサート領域が保持されていた。RT-PCR解析にて、うち2クローンですべての導入したcDNAに由来するmRNAが高発現していた。

GDNF, IGF-1, HGFのELISA, ルシフェラーゼ活性, GFPの信号の解析などにより、移植治療に最適と考えられる細胞株MSC3-31を得た(図3)。

本細胞株を使いSOD1^{G93A}モデルマウス(高発現マウス)へ60日, 80日, 100日齢で移植を行った(Table 1)。60日齢移植では雌のグループ間の比較においてのみ、罹病期間で統計的な有意差を認められた。80日齢では何れの項目でも有意差を認めなかった。100日齢では発症時期に移植群と対照間で差を認めなかったが、生存と罹病期間でMSC3-31移植群が有意に延長する傾向を認めた。

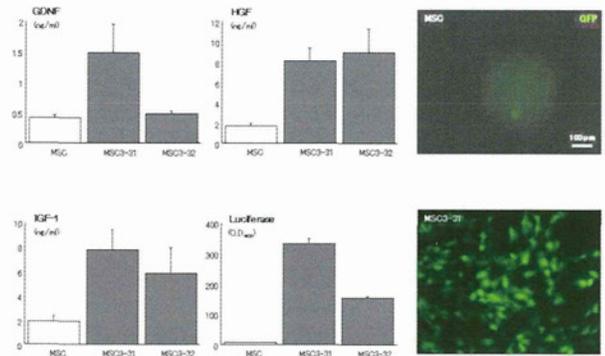


図3 細胞株スクリーニング

細胞培養上清でのGDNF, IGF-1, HGFのsandwich ELISAおよび顕微鏡下におけるGFP蛍光観察。

D. 考察

Table 1

60d (≒8w) transplantation (day, mean±S.E.)			
	age of onset	lifespans	disease duration
MSC3-31 (n=12)	120.3±2.1	144.6±2.2	24.3±2.4
♂ (n=5)	116.0±4.0	141.8±3.0	25.8±4.7
♀ (n=7)	123.3±1.5	146.6±3.1	23.3±2.8*
Sham (n=11)	121.5±2.4	141.6±3.0	20.2±3.0
♂ (n=5)	116.8±2.0	145.0±2.9	28.2±3.3
♀ (n=6)	125.3±3.4	138.8±5.0	13.5±2.6

80d (≒11w) transplantation			
	age of onset	lifespans	disease duration
MSC3-31 (n=11)	125.8±2.8	147.3±2.5	21.5±2.3
♂ (n=6)	121.0±2.9	142.4±2.6	21.6±4.2
♀ (n=5)	129.8±3.9	151.2±3.4	21.3±2.7
Sham (n=11)	121.9±1.6	143.7±2.8	21.8±2.6
♂ (n=6)	120.2±2.5	139.0±4.0	18.8±4.1
♀ (n=5)	124.0±1.5	149.4±1.9	25.4±2.7

100d (≒14w) transplantation			
	age of onset	lifespans	disease duration
MSC3-31 (n=14)	119.7±1.9	147.7±2.5*	28.0±2.2*
♂ (n=5)	115.8±4.2	142.3±2.9	26.5±2.7
♀ (n=9)	122.7±1.6	149.2±4.4	26.6±2.3
Sham (n=12)	120.1±1.4	140.8±1.3	20.8±2.0
♂ (n=5)	120.2±2.5	137.6±1.4	21.2±4.2
♀ (n=7)	124.0±1.5	143.1±4.4	20.4±2.0

* p < 0.05

幹細胞による再生医療、神経栄養因子による神経保護治療や遺伝子治療への期待は高いが、いまだ臨床応用には至っていない。その理由として、倫理的または医療としての安全性におけるハードルが高いという側面がある一方、それぞれ単独の治療での治療効果が期待値を上まわることができないという側面も無視できない。

今回我々は、現時点で治療効果が強く期待されているGDNF, IGF-1, HGFを高発現するMSC3-31を樹立した。これは、治療効果を最大限に引き出すことを主眼としたものであり、このような治療戦略の妥当性の検証を試みたものである。

Table 2

Report (year)	Cell source	Cell number	transplantation	Operation time (day)	Clinical effect on lifespan (day)	Control
Garbuzova-Davis S, et al (2002)	human NT neurons	1.5×10^5	Injection (L4-5)	53	128	106
Garbuzova-Davis S, et al (2006)	human NT neurons	7.5×10^5	L (multiple)	61	increased tendency	
Corti S, et al (2007)	mouse NSCs (Lewis X+, CXCR4+)	2×10^6	Injection (L4-5)	70	165.8 ± 9.2 ($p < 0.0001$)	142.8 ± 8.7
Martin LJ, et al (2007)	mouse (OB) NPCs	$1.0-3.0 \times 10^4$	Injection (L)	70	~ 170	~ 140
Park S, et al (2009)	human NPCs expressing BDNF, IGF-1, VEGF, NT-3, or GDNF	$1.2-1.8 \times 10^5$	Intrathecal (magna or lateral ventricles)	75	no improvement	
Zhang C, et al (2009)	human MSCs	5×10^5	Intrathecal (magna or lateral ventricles)	56 (single) 56, 70, 84 (multiple)	no improvement 155 ($p < 0.01$)	141
Kim H, et al (2009)	human MSCs	1×10^4 2×10^5 1×10^6	Intrathecal (magna)	60	128.0 ± 1.8 131.7 ± 1.2 ($p < 0.0001$) 134.0 ± 2.0 ($p < 0.0001$)	125.8 ± 1.1
Hwang DH, et al (2009)	human NSCs with or without expressing VEGF	1×10^5	intrathecal (L5 or L6)	60	141 (VEGF -) 145 (VEGF +) ($p < 0.01$)	133

NT neurons: neuron-like cells, NSCs: neuronal stem cells, NPCs: neural precursor (progenitor) cells, MSCs: mesenchymal stem (marrow stromal) cells, UBS: umbilical cord blood cells, BMCs: bone marrow cells, OB: olfactory bulb, G93A mice: SOD1 G93A mice, IV: intravenous, L: lumbar spinal cord, magna: foramen magna

Table 2 に我々の今回の検討と同様な SOD1^{G93A} 高発現マウスへの細胞移植研究のうち、生存 (lifespan) が明示されている報告を挙げた。上段は脊髄実質への直接注入，下段は髄腔内への投与である。いずれも 60・70 日齢（複数回投与の報告で 84 日齢）で移植がなされており有効例が散見される。これは我々の異なった SOD1 マウス（DF マウス）を使用した報告とも合致し，治療が奏効するためには，発症のかなり以前に細胞移植を行う必要があると考えられる。今回の我々の結果で最も注目した点は，発症のおよそ 20 日前の 100 日齢での移植で明瞭な効果が認められた。細胞移植の効果に相乗して HAC で発現させた栄養因子群が奏効した可能性を考えてるが，現在更に検討を進めている。

今後の検討項目として，発症時点（120 日齢）の移植でも有効性を示すか。移植細胞の運命（生存数，局在，分化）について検討の検討が必要である。また，脊髄腔への投与ではなく，経静脈的な投与での有効性の報告が散見されているため，本細胞株の経静脈的な投与での有効性も検討を予定している。

E. 結論

MSC と HAC を用いることによって複数神経栄養因子を中枢神経へデリバリーが可能となり，ALS モデルマウスへの治療効果を確認することができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

Yasuhiro Watanabe, Yasuhiro Kazuki, Shinya Kawase, Kenichi Yasui, Michio Kitayama, Toshiya Nakano, Mitsuo Osimura, and Kenji Nakashima. Establishment of the human immortal mesenchymal stem cells secreting multiple trophic factors using a human artificial chromosome. 22nd International Symposium on ALS/MND, Sydney.

人工染色体技術を利用した GDNF, IGF-1, HGF 分泌ヒト骨髄間葉系幹細胞の樹立. 渡辺保裕, 香月康宏, 河瀬真也, 安井建一, 北山通朗, 中野俊也, 押村光雄, 中島健二. 第 53 回日本神経学会総会.