

201442018A

厚生労働科学研究委託費 難治性疾患等克服研究事業

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

筋萎縮性側索硬化症（ALS）新規治療法開発をめざした病態解明

平成 26 年度 研究報告書

研究代表者 青木 正志

平成 27（2015）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 新規治療法開発をめざした病態解明	
研究代表者 青木 正志 (東北大学大学院医学系研究科神経内科)	
II. 分担研究報告書	
ALS ラットモデル微小血管周皮細胞の新生	5
青木 正志 (東北大学大学院医学系研究科神経内科)	
H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 家系の臨床経過の解析	7
阿部 康二 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科神経内科学)	
iPS 細胞を用いた ALS の病態解明と新規治療法の開発	9
岡野 栄之 (慶應義塾大学医学部生理学教室)	
筋萎縮性側索硬化症運動神経細胞における TDP-43 mRNA の細胞内局在解析	13
小野寺 理 (新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野)	
モデル動物を用いた孤発性 ALS の治療法開発	16
郭 伸 (東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門)	
運動ニューロン病遺伝子 TFG トランスジェニックマウスの作製・解析	20
梶 龍兒 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床神経科学分野)	
2-デオキシ-D-グルコースによる筋萎縮性側索硬化症(ALS)治療薬戦略的治療	23
加藤 信介 (鳥取大学医学部病理学講座脳病態医科学分野)	
孤発性 ALS に認められたコピー数多型(copy number variation: CNV)と 臨床所見との関連についての検討	28
加藤 丈夫 (山形大学第三内科)	

オプチニューリンノックアウトマウスの作製と評価-----	31
川上 秀史 (広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野)	
孤発性 ALS では circulating small RNA の恒常性が低下する -----	33
佐々木 秀直 (北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野)	
FUS の AMPA 受容体機能調節を介した ALS/ FTLD 症候発現機序の解明 -----	36
祖父江 元 (名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学)	
ES/iPS 細胞から運動神経細胞の分化誘導を促進する低分子化合物の スクリーニング-----	39
高橋 良輔 (京都大学医学研究科神経内科学)	
Parkin による不良ミトコンドリア処理の分子機構 -----	41
田中 啓二 (公益財団法人東京都医学総合研究所)	
TDP-43 の神経細胞毒性 -----	47
長谷川 成人 (東京都医学総合研究所認知症・高次脳機能研究分野)	
Tg-SOD1G93A の血液中変動分子の質量分析計を用いた網羅的解析 -----	51
船越 洋 (旭川医科大学教育研究推進センター)	
ALS における新規の内在性神経保護因子の同定 -----	54
山中 宏二 (名古屋大学環境医学研究所病態神経科学分野)	
TDP-43 断片の exosome への選択的取り込みについて -----	60
横田 隆徳 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学)	
III. 研究成果刊行一覧 -----	63
IV. ワークショップ, 班会議 プログラム	
V. 班体制	

I . 総括研究報告書

総括研究報告書

筋萎縮性側索硬化症（ALS）新規治療法開発をめざした病態解明

研究代表者：青木 正志

東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学講座神経内科学分野

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）は致死的神経変性疾患でありながら有効な治療法が未確立で新規治療法開発が強く求められている難治性疾患の代表である。本研究は ALS の新規医薬品開発をめざした病態解明を目的とし、基礎・臨床両分野の第一線の研究成果を有機的に包括し、前臨床試験から治験実施をめざした実用化研究を行う。

ALS 医薬品開発に必須の課題：(1) 近年明らかとなってきた ALS 病態の主要分子：SOD1, FUS, TDP-43, optineurin, TFG, ADAR2 病態解明および分子標的治療戦略の開発、(2) 新規かつ複数の改良型 ALS 動物モデル・細胞モデル、ヒト近縁動物モデルの開発、(3) ALS 以外の神経変性疾患とも共通する重要病態（不良ミトコンドリア浄化障害、神経炎症、病原蛋白質伝播）、(4) 診断・病態バイオマーカー開発、そして (5) 神経再生療法の開発に取り組んでいる。

初年度、本研究により新規 ALS 動物モデルの作出、新規経口薬や治療的 ADAR2 遺伝子導入療法の前臨床試験、不良ミトコンドリア処理機構の解明や ALS 主要病態解明といった進捗が得られた。今後、継続的に研究組織体制の充実を図り、臨床応用シーズとなる候補医薬品の前臨床試験に注力した後、治験プロトコル作成までを含めた実用化研究を継続する。

研究分担者

浅田 隆太 名古屋医療センター臨床研究センター臨床研究事業部研究開発推進室 室長
阿部 康二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経内科学 教授
岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学 教授
小野寺 理 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学 教授
郭 伸 東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門 客員研究員
梶 龍兒 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床神経科学分野 教授
加藤 信介 鳥取大学医学部脳病態医科学分野 准教授
加藤 丈夫 山形大学医学部器官病態統御学生命情報内科学分野 教授
川上 秀史 広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野 教授
佐々木秀直 北海道大学大学院医学研究科神経病態学講座神経内科学分野 教授
祖父江 元 名古屋大学大学院医学系研究科神経内科学 教授
高橋 良輔 京都大学大学院医学研究科臨床神経学 教授
田中 啓二 東京都医学総合研究所 所長
長谷川成人 東京都医学総合研究所認知症・高次脳機能研究分野 分野長
船越 洋 旭川医科大学教育研究推進センター センター長・教授
山中 宏二 名古屋大学環境医学研究所病態神経科学分野 教授
横田隆徳 東京医科歯科大学大学院脳神経病態学 教授

A. 研究目的

本研究では、筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）の病態解明研究に基づく

新規治療法開発を主たる目的とし、基礎・臨床両分野の研究成果を有機的に結集し、いち早い臨床応用をめざしている（橋渡し研究）。

ALSは成人発症の進行性運動ニューロン機能障害・細胞死を主徴とする致死的神経変性疾患であり、全身の骨格筋萎縮と筋力低下が進行して発症後平均3~5年で呼吸筋麻痺に至る。それにもかかわらず症状を改善する治療法は未確立で、有効性の高い新規治療法開発が強く求められている。近年までにALSの原因となる変異遺伝子、病態関連分子が本邦あるいは海外から続々と発見されつつあり、ALS研究は加速度的に進展している。このような背景のもと本研究では、以下のような研究成果が複数得られている。

B/C/D. 研究方法・研究結果・考察

【ALS主要分子病態の解明】

transactive response (TAR) DNA-binding protein-43 kDa (TDP-43)はALSと前頭側頭葉変性症(FTLD)に共通して罹患者脳に蓄積する異常構造物の主要構成蛋白質である。このTDP-43 mRNAをヒト剖検脊髄で定量できる新規解析手法を用い、孤発性ALS脊髄運動ニューロン細胞質TDP-43 mRNA量が増加していることを明らかにした。このことから、孤発性ALSではTDP-43の自己量調節機構の破綻が病態背景に示唆され、その制御が治療標的になり得る。

さらに、TDP-43の神経細胞毒性を明らかにするため、ヒト培養神経細胞を用いてTDP-43全長および断片を発現させ解析した。全長TDP-43は過剰発現させるだけで細胞周期の異常とアポトーシスを誘導した。一方、C末端断片を発現させると細胞内TDP-43凝集体を形成し細胞増殖を抑制した。この凝集体によるRNAポリメラーゼIIや基本転写因子の取込が見出され、FTLD罹患者脳でも同様の現象が確認された。

病的性質を有したTDP-43が細胞間伝播によって拡がることでALS神経変性が進展すると考えられているが、その機序は不明であった。今回、細胞外に放出される微小胞であるexosome内にTDP-43断片が選択的に存在することを明らかにし、それが*in vivo*でマウス脳の神経細胞内に取り込まれることを証明した。ALS病態進展へのexosome関与が示唆され、ALS進行抑止療法の開発につながる。

*FUS*はALS/FTLDの原因遺伝子であり、その病態解明は広く治療法開発の糸口となる。*FUS*の

生理的機能喪失が病態形成に関与すると想定し、*FUS*特異的shRNAによる*FUS*ノックダウンマウスを作出した。このモデルマウスから新規*FUS*標的分子としてグルタミン酸受容体サブユニットGluA1を同定した。本マウスにおいて、シナプス成熟異常、シナプス伝達異常のほか、多動、脱抑制、社会性行動異常といった表現型の発現にも成功した。GluA1発現異常を標的とした介入研究を開始しており、新たなALS/FTLD治療戦略の開発に有用である。

一方、家族性ALSで最初に見出された原因遺伝子Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD1*)は遺伝子型と表現型に一定の相関が知られている。とくにHis46Arg (H46R変異)*SOD1*関連家族性ALSでは極めて緩徐な経過と同一家系内表現型の多様性が明らかになった。

【新規細胞モデル・動物モデルの開発】

代表的ALS原因遺伝子(孤発性ALSとFTLDで蓄積する蛋白質TDP-43をコードする)

*TARDBP*とfused in sarcoma/translated in liposarcoma (*FUS*)に変異をもつ二種の家族性ALS罹患者由来iPS細胞株を樹立、運動ニューロンへ分化誘導した。多角的に細胞生物学的解析をおこない、TDP-43、*FUS*ともに複数の病態が確認でき、新規ALS細胞モデル開発に成功した。*FUS*-iPS細胞から誘導した運動ニューロンの表現型を評価項目として既存薬スクリーニングを実施し、3種類の治療薬候補を見出した。これら新規ALS細胞モデルはALS創薬へとつながる。

ALS罹患者と同じ遺伝情報をもつ運動ニューロンを作製し研究対象とすることは本研究に必須である。しかしながらiPS細胞からの分化誘導効率は高くないことから、これを促進する低分子化合物のスクリーニング系を確立した。今後、本実験系を用いたハイスループットスクリーニングを行い、ヒット化合物を複数同定して運動ニューロンへの分化誘導促進機構の解明も行う。

孤発性ALS運動ニューロンにおける疾患特異的かつ細胞選択的分子変化、adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2)発現低下によって引き起こされるGluA2 Q/R部位のRNA編集異常は、疾患特異的かつ細胞選択的分子変化として見出されている。これを再現した動物モデ

ル（運動ニューロン選択的コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス、AR2 マウス）は ALS の病理学的指標である TDP-43 の細胞質内異常蓄積像も示す新規 ALS 動物モデルとなった。

2012 年に発見された新規 ALS 原因遺伝子 TRK-fused gene (*TFG*)、その遺伝子変異による運動ニューロン変性病態の解明は新たな治療標的遺伝子発見につながると考えられる。変異 *TFG* 遺伝子導入マウスを作出し、中枢神経系に導入遺伝子産物 (*TFG* 蛋白質) の発現を確認でき、ヒト *TFG* 蛋白過剰発現マウスの作成に成功した。新規 ALS モデル動物としての妥当性を病理学的・生化学的解析により検証する。

2010 年に本邦から報告された新規 ALS 原因遺伝子 optineurin (*OPTN*) は、炎症や蛋白質分解・オートファジーに関与する多機能分子である。*OPTN* の ALS 発症機序を解明し、新たな ALS 動物モデルを確立するため、*OPTN* ノックアウトマウスを作出した。24 カ月間にわたる観察では明らかな ALS 表現型が得られず、種々のストレス負荷による病態発現を検証する。

【神経変性に共通する重要病態の解明】

不良ミトコンドリアは DNA、蛋白質、脂質などを傷害して機能不全を起こす活性酸素種の産生を亢進させる。したがって不良ミトコンドリアを処理し浄化する機構は細胞の恒常性維持に必須である。今回、PINK1 依存性の細胞質 Parkin 活性化機構と Parkin の不良ミトコンドリアへのリクルート機構を解明した。PINK1 はリン酸化修飾によるユビキチン機能変換を引き起こすこと、リン酸化ポリユビキチン鎖が活性化 Parkin の受容体となってミトコンドリアに大量の Parkin をリクルートすることが明らかとなった。このミトコンドリア品質管理機構の破綻は広く神経変性病態におけるニューロン死の主因と考えられていることから、その分子連関を明らかにして、ALS 新規治療標的を見出す。

【臨床応用をめざした新規治療法開発】

孤発性 ALS の分子変化を再現した上述の AR2 マウスを用い、ADAR2 の治療的遺伝子導入療法を開発し、さらに AMPA 受容体アンタゴニストによる薬物療法を併用することで、病状進行抑制

が得られた。この前臨床試験の成功は、AR2 マウスの有用性のみならず、経静脈的投与で中枢神経系へ広く遺伝子導入が可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる治療的遺伝子の安全かつ効果的な遺伝子導入法の有用性をも示し、臨床応用に向けた開発計画が進行中である。

すでに非プリン型キサンチン酸化還元酵素 (XOR) は、変異 *SOD1* 関連 ALS モデルマウスに対する有効性が確認でき、臨床応用が期待されている。今回、新たに 2-デオキシ-D-グルコース (2DG) を発症後の ALS モデルマウスに連日経口投与し、有意な病悩期間・生存期間延長効果を明らかにした。XOR 同様に新規 ALS 経口薬として開発するため、作用メカニズムの解析と至適用量の決定といった前臨床試験を継続する。

生体内に本来備わっている内在性の神経保護経路の活性化は新規 ALS 治療戦略となる。今回、ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 およびシステインプロテアーゼ阻害因子 シスタチン C (CysC) の神経保護効果を明らかにした。SIRT1 を中枢神経系で過剰発現させた ALS モデルマウスでは生存期間の有意な延長がみられ、毒性の高い *SOD1* 凝集体を減少させるメカニズムが示唆された。また、CysC は神経系培養細胞に対して変異 *SOD1* 毒性を抑制した。CysC は ALS 特異的運動ニューロン細胞質内封入体・Bunina 小体の主要構成蛋白質である。このような複数の神経保護経路の活性化が新たな ALS 治療戦略となり得る。

【発症リスク遺伝子・miRNA バイオマーカー】

ALS 全体の約 90% を占める孤発性 ALS の疾患感受性遺伝子 (リスク遺伝子) として見出した isopentenyl diphosphate isomerases 1 & 2

(*IDII-2*) および protein convertase subtilisin/kexin type 6 (*PCSK6*) のコピー数多型 (copy number variation, CNV) は、発症と有意に関連する。孤発性 ALS の臨床症候と CNV の関連を検討し、*PCSK6* の 3' 領域の CNV 異常をもつ症例では ALS 臨床徴候の一つ、線維束性収縮を認める度が有意に高いことが明らかとなった。多数例での再現性確認とさらなるリスク遺伝子の探索を行う。

臨床／基礎いずれの研究においても、ALS 病態と関連する血中バイオマーカーを見出すことは重

要である。ALS 患者血漿中の small RNA を解析し、ALS 罹患者血漿中の small RNA の電気泳動パターンが明らかに正常対照と異なり、かつ miRNA を含む小さな画分の割合が高いことが判明した。ALS における RNA splicing 異常仮説を支持する結果であり、さらなる ALS 疾患特異性の高い miRNA バイオマーカーの開発が期待される。

【神経再生療法の開発】

変異 *SOD1* 導入 ALS モデルマウスを用い、すでに ALS 治験が実施中の再生因子、肝細胞増殖因子 (HGF) と協調して ALS 病態進行を抑制する因子の網羅的解析を開始した。モデルマウス血液中の変動因子を経時的に質量分析計で解析し、野生型対照と比較して変動する種々の因子が見出された。この中から病態進行抑制因子を発見し、HGF と併用可能な治療薬候補を探索する。

ALS 病態における脳・脊髄の微小血管は 2 つの点から注目されている。微小血管障害が神経変性を加速し得ること、もう一つは血管新生が神経新生の足場となることである。微小血管の機能維持に必須の血管壁細胞、周皮細胞の新生を解析した。ALS モデルラット脊髄では、病変部位を中心に発症前から周皮細胞が新生増殖していた。介入研究による意義を解明することで、新たな治療標的となる可能性がある。

E. 結論

本研究では、(1) ALS 分子病態解明と臨床応用をめざした新規治療法開発、(2) 複数の新規 ALS 細胞・動物モデル確立、(3) 神経変性に共通する重要病態の解明、(4) バイオマーカー開発、そして (5) 神経再生療法の開発、といった重要課題に取り組んでおり、結果として ALS に限らず広く希少難治性疾患を対象とした研究組織体制の構築と創薬プラットフォーム確立にもつながる重要な意義をもっている。

初年度、本研究により ALS 主要分子病態や ALS 病態進展機構、および広く神経変性に関わる不良ミトコンドリア浄化機構の一旦を解明することができ、複数の新規 ALS 細胞・動物モデル作出に成功した。さらに既存の動物モデルを活用した新規経口薬および治療的 ADAR2 遺伝子導入療法の

開発を進めた。これらの開発研究を継続・発展させ、病態解明に基づく ALS 創薬をめざして臨床応用シーズ候補の前臨床試験を実施する。

今後、短期的には ALS に対する「分子標的治療薬の開発」に注力し、ついで中・長期的には遺伝子治療、神経再生療法の開発を倫理面に十分配慮しつつ実施する。本研究課題の解決は、ALS に限らず広く難治性希少疾患を対象とした医薬品開発と行政・難病施策への貢献、新たな医薬品産業創出にもつながると期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

別掲 (分担研究報告書)

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

別掲 (分担研究報告書)

Ⅱ. 分担研究報告書

分担研究報告書

ALS ラットモデル微小血管周皮細胞の新生

研究代表者：青木正志

研究協力者：割田 仁，四條友望，池田謙輔，秋山徹也，小野洋也，加藤昌昭，
鈴木直輝

東北大学大学院医学系研究科神経内科学，東北大学病院 ALS 治療法開発センター

研究要旨

ALS における脊髄運動ニューロン変性脱落は、早くからニューロン以外の細胞増殖をもたらす。本研究では、神経再生・神経変性の両者において重要な意義をもつとされる微小血管に注目し、その機能維持に重要な周皮細胞の変性病態下における新生増殖を見出した。ALS モデルラット脊髄では病変の主座である前角では発症前から、また中心管周囲においては発症早期から有意な周皮細胞新生増加が認められた。周皮細胞は微小血管における血液-脊髄関門の保持、神経-血管ユニットの恒常性維持に重要なことから、これらの細胞と微小血管を標的とした新たな治療戦略開発の可能性がある。

A. 研究目的

微小血管の周皮細胞は成体中枢神経系の神経血管ユニット機能調節、および損傷時に誘導される血管新生において重要な役割を担っている (Bell RD, *et al.* 2010)。また近年、周皮細胞欠損マウスでは神経変性が生じることが報告された。一方、家族性・孤発性 ALS の剖検脊髄微小血管における周皮細胞の減少と血管壁からの脱離が報告されている (Winkler EA, *et al.* 2013)。今回、私たちは内在性神経再生の足場となる血管新生に重要で、神経変性とも密接な関わりを持ち得る pericyte の新生増殖について、ALS モデル動物を用いて検索した。

B. 研究方法

当科自験家族性 ALS 111 家系のうち、28%ともっとも多い原因遺伝子 *SOD1* (Cu/Zn superoxide dismutase)、その家族性 ALS 関連ヒト変異 *SOD1* を導入した全身の変異 *SOD1* 過剰発現モデルラットを用いた。同ラット ALS モデル (Tg) を発症前・発症早期・後期の 3 群に分け、週齢一致野生型同腹仔 (Wt) を対照とした (各群 n=4)。チミジンアナログ持続投与により新生細胞核を標識し、腰髄灌流固定後凍結切片を作成した。各種選択的細胞マーカーを用いた多重免疫蛍光組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡画像上で半

定量・統計学的解析を加えた。脊髄前角 (ventral horn, 以下 VH)、および脊髄中心管周囲灰白質 (peri-central canal, CC) にそれぞれ設定した $5.0 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ の関心領域における新生周皮細胞密度 (/mm²) を算出し、変性病態との関連を経時的かつ組織学的に解析した。

[倫理面への配慮]

動物を用いた実験はすべて東北大学の動物実験等に関する規定に基づいて施行し (2013 医動-030)、また利用動物数を極力減らすように努め、動物愛護面に十分配慮した。また組換え DNA 実験はすべて東北大学の遺伝子組換え実験安全管理規定に基づいて施行された (2013 医組換-001)。

C. 研究結果

周皮細胞は微小血管壁細胞のひとつとして、血管内皮細胞と astrocyte 終足間に基底膜で囲まれた細胞として同定された。Wt 群に比して Tg 群の VH を含む脊髄腹側では発症前より、神経変性とともに新生周皮細胞の有意な増加を認めた

($P < 0.001$, one-way analysis of variance with Tukey's multiple comparison test)。そのピークは発症後早期にあり、後期にはその程度を減じる傾向を認めた。遅れて発症後早期より Tg 群の CC においても有意な周皮細胞新生増加が明らかとなった ($P < 0.001$)。

D. 考察

本モデルラット脊髄の ALS 様病態では、神経変性と並行して新生細胞の有意な増加が認められている。その多くはグリオシスおよびグリア炎症に関与している一方で、内在性神経幹/前駆細胞の反応性増加と微小血管新生が生じていることを報告してきた。しかしながら、新生微小血管は血液-脊髄関門が脆弱であり、適切なコントロールには周皮細胞の接着と機能連関が不可欠である。

本研究で明らかとなった周皮細胞新生の意義は未解明であるが、(1) 微小血管新生に伴う内在性再生機転のひとつ、あるいは (2) 新生微小血管の血液-脊髄関門不全に対する代償機転、(3) 変性病態を抑止/促進、といった種々の可能性がある。したがって、詳細な組織学的検討や *in vitro* における検討を加えるとともに、周皮細胞新生に対する介入研究が必要である。

E. 結論

本 ALS モデル変性病態下の脊髄に周皮細胞の新生促進を見出した。新生微小血管との機能的関連、神経再生と神経変性における役割について介入研究を要する。内在性神経再生の促進をねらうにあたり、周皮細胞は新たな治療標的となる可能性がある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitajima Y, Tashiro Y, Suzuki N, ..., Aoki M. Proteasome dysfunction induces muscle growth defects and protein aggregation. **J Cell Sci** 2014; 127(24): 5204-5217.
- 2) Izumi R, Niihori T, Suzuki N, ..., Aoki M. GNE myopathy associated with congenital thrombocytopenia: A report of two siblings. **Neuromuscul Disord** 2014; 24(12): 1068-1072.
- 3) Akaishi T, Tateyama M, Kato K, ..., Suzuki N, ..., Aoki M. An autopsy case involving a

12-year history of amyotrophic lateral sclerosis with CIDP-like polyneuropathy. **Intern Med** 2014; 53(12): 1371-1375.

2. 学会発表

- 1) 青木正志, 割田 仁, 加藤昌昭, 鈴木直輝, 中村雅也, 岡野栄之, 船越 洋. (シンポジウム) ALS 治療法開発への神経科学の挑戦: 肝細胞増殖因子 (HGF) による筋萎縮性側索硬化症の新規治療法開発. 第 37 回日本神経科学学会大会 Neuroscience 2014 (横浜) 2014 年 9 月 11~13 日
- 2) 割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 小野洋也, 加藤昌昭, 鈴木直輝, 船越 洋, 青木正志. 成体ラット運動ニューロン変性モデル脊髄における潜在的再生能. 同上
- 3) 割田 仁, 水野秀紀, 加藤昌昭, 井泉瑠美子, 西山亜由美, 鈴木直輝, 青木正志. 筋萎縮性側索硬化症モデル成体脊髄における潜在的 neurogenic niche. 第 55 回日本神経学会学術大会 2014 年 5 月 21~24 日 (福岡)
- 4) 加藤昌昭, 割田 仁, 井泉瑠美子, 西山亜由美, 青木正志. FUS/TLS 遺伝子変異型と ALS 表現形の関連について. 同上

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

ラットを用いた ALS モデル (出願済)

2. 実用新案登録

該当なし

分担研究報告書

H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 家系の臨床経過の解析

研究分担者：阿部康二¹⁾

研究協力者：太田康之¹⁾，松園構佑¹⁾，菱川 望¹⁾，山下 徹¹⁾，佐藤恒太¹⁾，
河野祥一朗¹⁾，出口健太郎¹⁾，大窪隆一²⁾，高嶋 博²⁾，塩見一剛³⁾，
中里雅光³⁾

- 1) 岡山大学神経内科
- 2) 鹿児島大学神経内科・老年病学
- 3) 宮崎大学神経呼吸内分泌代謝学

研究要旨

H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 患者の臨床症状は一側の下肢筋力低下から始まり、球麻痺症状を示さず、孤発性 ALS 患者と比べて非常に緩徐に進行するが、以前に報告された都城市内の H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 家系の患者のその後の臨床経過を解析したところ、臨床経過は過去の報告より非常に緩徐であり、同じ家系内でも発症年齢と発症部位に違いがあることが判明した。

A. 研究目的

H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 患者の臨床症状は一側の下肢筋力低下から始まり、孤発性 ALS 患者と比べて非常に緩徐に進行することが報告されている。本研究では、以前に報告された H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 家系の患者のその後の臨床経過を解析した。

B. 研究方法

以前に報告された、宮崎県都城市在住の H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS 家系の患者 3 人（母、長男、長女）を都城市内で往診し、その後の臨床経過を解析した。

（倫理面への配慮）

個人情報への守秘に配慮した。

C. 研究結果

母に加え、3 人の子供全員（長男、長女、次女）とも新たに ALS を発症していた。発症年齢は母、長男、長女は 50 歳代の発症であったが、次女は 30 歳代の発症だった。診察した患者 3 人とも一側の下肢筋力低下から発症したが、母

と長男は左下肢からの発症であり、次女は右下肢から発症した。運動ニューロン徴候は下位運動ニューロン徴候が主体であり、球麻痺症状は認めなかった。特に母は 27 年の経過で現在 83 歳であり、四肢筋力低下は高度であったが、呼吸機能は保たれており、ALS 進行は非常に緩徐であった。過去の都城と海外の H46R-SOD1 遺伝子変異の ALS 家系の報告と比較しても、母の経過は非常に緩徐であることが判明した。

D. 考察

同じ家系であっても発症年齢と発症部位に違いがあり、H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS の臨床経過は同一家系でも違いがあることが示唆された。

E. 結論

H46R-SOD1 遺伝子変異を有する遺伝性 ALS の臨床経過は孤発性 ALS 患者と比べて非常に緩徐であり、同一家系でも発症年齢や発症部位に違いがある。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe K, Itoyama Y, Sobue G, Tsuji S, Aoki M, Doyu M, Hamada C, Kondo K, Yoneoka T, Akimoto M, Yoshino H; Edaravone ALS Study Group. Confirmatory double-blind, parallel-group, placebo-controlled study of efficacy and safety of edaravone (MCI-186) in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 2014; 15: 610-7.
2. Sato K, Morimoto N, Deguchi K, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Seven amyotrophic lateral sclerosis patients diagnosed only after development of respiratory failure. *J Clin Neurosci.* 2014; 21: 1341-3.
3. Morimoto N, Kurata T, Sato K, Ikeda Y, Sato S, Abe K. Frontal dysfunctions of ALS-PBP patients in relation to their bulbar symptoms and rCBF decline. *J Neurol Sci.* 012; 319: 96-101.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

分担研究報告書

iPS 細胞を用いた ALS の病態解明と新規治療法の開発

研究分担者：岡野栄之

慶應義塾大学生理学教室

研究要旨

二種の家族性 ALS 患者由来 iPS 細胞株（TDP43-iPS と FUS-iPS）を運動ニューロンへと分化誘導し、神経突起長変化を病態時期の指標として多角的な病態解析を実施した。TDP43 と FUS いずれにおいても複数の病態検出に成功し、特に FUS では見出した表現型を評価項目として既存薬スクリーニングを実施し 3 種類の治療薬候補を見出した。

A. 研究目的

ALS 患者由来の iPS 細胞を用いることで *in vitro* で ALS 病態を再現し、これまで観察できなかった病態の経時的変化や新たな病態所見を見出す。さらにはこれら病態所見を評価項目として既存薬スクリーニングを実施し ALS 治療薬創出へとつなげることを本研究の目的とする。

B. 研究方法

ALS 患者由来 iPS 細胞として、京都大学 iPS 細胞研究所より譲り受けた TDP43 変異型の家族性 ALS-iPS 細胞（TDP43-iPS）と本研究室で樹立した FUS 変異型の家族性 ALS-iPS 細胞（FUS-iPS）を使用した。本研究室で独自に開発した迅速かつ高効率な運動ニューロン分化誘導法を既述した iPS 細胞に適用し病態解析を実施した。病態解析を実施するにあたっては、至適な病態時期を見出すために *in vitro* において神経細胞死に近似される神経突起長減少に着目した。ALS 群において神経突起長が減少し始める時期を病態初期と定義し、この病態初期において特定タンパク質の凝集など複数の表現型解析を実施した。

さらに FUS-iPS においては見出した複数の表現型を評価項目として既存薬スクリーニングを実施した。

（倫理面への配慮）

学内倫理審査会の承認を得て行われている。

課題名：神経疾患患者からの iPS 細胞の樹立とそれを用いた疾患解析に関する研究

承認番号：20080016

C. 研究結果

まず ALS-iPS 細胞の運動ニューロン分化誘導効率を確認したところ、いずれの細胞株も健常者由来の iPS 細胞株と同程度の 50~60% の誘導効率を示した。

次に TDP43-iPS と FUS-iPS 由来運動ニューロンの経時的な神経突起長変化を確認したところ TDP43-iPS においては Day20 前後から、FUS-iPS においては Day25 前後から神経突起長減少が始まることが確認された。本所見から TDP43-iPS は神経分化誘導後 Day15 を、FUS-iPS は神経分化誘導後 Day20 を病態初期と定義し、病態解析を実施した。

TDP43-iPS を用いて解析したところ、健常者群と比較してリン酸化 TDP-43 凝集体の増加や Cleaved Caspase-3 の上昇、LDH 漏出量の増加が確認された。さらには長期培養することで運動ニューロン選択的な細胞死が起こることも確認されている。

一方 FUS-iPS では、FUS タンパクの細胞質内局在異常や凝集体の確認、ストレス顆粒の形成、Cleaved Caspase-3 の上昇、LDH 漏出量の増加が確認された。特に FUS タンパク凝集体とスト

レス顆粒の形成は細胞外ストレス環境下において顕著な増加が確認された。

FUS-iPSにおいては上述した複数の表現型を評価項目として既存薬スクリーニングも実施している。現在 270 種類の既存薬を検討し、3 種類の治療薬候補を見出している。

D. 考察

TDP43-iPS と FUS-iPS いずれの解析においても、これまでに報告されている表現型の再現・iPS 細胞を用いた解析では報告されていない表現型の検出に成功している。さらに、本研究から神経突起長減少が起こる前段階で病態検出可能であることが明らかとなった。

一方で、その病態メカニズムに関しては未だに不明であり、今後の検討課題である。既存薬スクリーニングで見出した薬剤の薬効メカニズムを足掛かりに ALS 病態解明を図りたい。

そのほかにも、電気生理学的解析など解析の幅を拡げ、病態解明へとつなげる予定である。

E. 結論

二種の家族性 ALS 患者由来 iPS 細胞株 (TDP43-iPS と FUS-iPS) を用いて神経細胞死や特定タンパクの凝集など複数の病態検出に成功した。特に FUS-iPS では既存薬スクリーニングを実施し 3 種類の治療薬候補を見出した。

本研究は今後の ALS 病態解明の足掛かりになるだけでなく、適応拡大による ALS 治療薬創出へとつながる画期的な成果である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujioka M, Okano H, Edge AS. Manipulating cell fate in the cochlea: a feasible therapy for hearing loss. *Trends Neurosci.* 2015 [Epub ahead of print]
2. Maekawa M, Yamada K, Toyoshima M, Ohnishi T, Iwayama Y, Shimamoto C,

Toyota T, Nozaki Y, Balan S, Matsuzaki H, Iwata Y, Suzuki K, Miyashita M, Kikuchi M, Kato M, Okada Y, Akamatsu W, Mori N, Owada Y, Itokawa M, Okano H, Yoshikawa T. Utility of Scalp Hair Follicles as a Novel Source of Biomarker Genes for Psychiatric Illnesses. *Biol Psychiatry.* 2014 [Epub ahead of print]

3. Zhang H, Tan E, Suzuki Y, Hirose Y, Kinoshita S, Okano H, Kudoh J, Shimizu A, Saito K, Watabe S, Asakawa S. Dramatic improvement in genome assembly achieved using doubled-haploid genomes. *Sci Rep.* 27; 4: 6780. 2014
4. Kuwako K, Nishimoto Y, Kawase S, Okano HJ, Okano H. Cadherin-7 Regulates Mossy Fiber Connectivity in the Cerebellum. *Cell Rep.* 9; 9(1): 311-23. 2014
5. Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A, Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, Inoue H. Focal Transplantation of Human iPSC-Derived Glial-Rich Neural Progenitors Improves Lifespan of ALS Mice. *Stem Cell Reports.* 12; 3(2): 242-9. 2014
6. Matsuzaki Y, Mabuchi Y, Okano H. Leptin Receptor Makes Its Mark on MSCs. *Cell Stem Cell.* 7; 15(2): 112-4. 2014
7. Murota Y, Ishizu H, Nakagawa S, Iwasaki YW, Shibata S, Kamatani MK, Saito K, Okano H, Siomi H, Siomi MC. Yb Integrates piRNA Intermediates and Processing Factors into Perinuclear Bodies to Enhance piRISC Assembly. *Cell Rep.* 10; 8(1):103-13. 2014
8. Numasawa-Kuroiwa Y, Okada Y, Shibata S, Kishi N, Akamatsu W, Shoji M, Nakanishi A, Oyama M, Osaka H, Inoue K, Takahashi K, Yamanaka S, Kosaki K, Takahashi T, Okano H. Involvement of

- ER Stress in Dysmyelination of Pelizaeus-Merzbacher Disease with PLP1 Missense Mutations Shown by iPSC-Derived Oligodendrocytes. *Stem Cell Reports*. 24; 2(5) :648-61. 2014
9. Yoshida T, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol Brain*. 16; 7(1): 45. 2014
 10. Nishimura S, Sasaki T, Shimizu A, Yoshida K, Iwai H, Koya I, Kobayashi Y, Iakura G, Shibata S, Ebise H, Horiuchi K, Kudoh J, Toyama Y, Anderson AJ, Okano H, Nakamura M. Global gene expression analysis following spinal cord injury in non-human primates. *Exp Neurol*.; 261:171-9. 2014
 11. Zhou Z, Kohda K, Iyata K, Kohyama J, Akamatsu W, Yuzaki M, Okano HJ, Sasaki E, Okano H. Reprogramming non-human primate somatic cells into functional neuronal cells by defined factors. *Mol Brain*. 3; 7: 24. 2014
2. 学会発表
1. Hideyuki Okano: Modeling neurological and psychiatric disorders using iPSCs technologies and transgenic non-human primates. : Keystone Symposia Stem Cells and Reprogramming(Z4), (Resort at Squaw Creek • Olympic Valley, California USA) 2014.4.6-11
 2. Hideyuki Okano: Brain science using iPS Cell technology and transgenic non-human primates. : 29th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology (CINP-The International College of Neuropsychopharmacology), Plenary Lecture, (Vancouver Convention Centre, Vancouver, Canada) 2014.6.22-26
 3. Hideyuki Okano: Modeling neurological and psychiatric disorders using iPSC technologies and transgenic non-human primates. : BRIDGING BIOMEDICAL WORLDS (BBW 2014) - Turning obstacles into opportunities for stem cell therapy, (China National Convention Center (CNCC), Beijing, PR China) 2014.10.13-15
 4. Hideyuki Okano: iPS Cell Technologies: Significance and Applications to CNS Regeneration and Disease Research. :2014 WASF on Stem Cell Research and Regenerative Medicine “The Impact of Regenerative Medicine 2014”, (Mission Bay Conference Center at UCSF, San Francisco, USA) 2014.11.6-7
 5. Hideyuki Okano: Transgenic marmosets for modeling human neurological and psychiatric disorders: Minisymposium 668 "Transgenic Primate Models of Human Brain" at Neuroscience (the Walter E. Washington Convention Center, Washington DC, USA) 2014.11.15-19
 6. Hideyuki Okano: Modeling psychiatric/neurological disorders using iPSC cell technologies and transgenic non-human primates. : BROAD Institute Seminar, (Auditorium, BROAD Institute, MA, USA) 2014.12.4
 7. Hideyuki Okano: Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on human iPSC cells.: The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience”iPS Cells for Regenerative Medicine”, (Center for Learning and Innovation (CLI), Takeda Pharmaceutical Company, Ltd., Suita, Japan) 2015.1.15-17

H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

1. 特許取得(出願)

（発明の名称） 内耳細胞誘導方法

（出願番号） 特願 2014-100017

（出願日） 2014/05/13

（出願人名） 学校法人慶應義塾

（発明者） 細谷 誠,岡野栄之,藤岡正人

2. 実用新案登録

該当無し

分担研究報告書

筋萎縮性側索硬化症運動神経細胞における

TDP-43 mRNA の細胞内局在解析

研究分担者：小野寺 理¹⁾

研究協力者：加藤泰介¹⁾，小山哲秀²⁾，須貝章弘³⁾，豊島靖子⁴⁾，

柿田明美⁵⁾，高橋 均⁴⁾，西澤正豊³⁾

1) 新潟大学脳研究所分子神経疾患資源解析学分野

2) 新潟大学超域学術院

3) 新潟大学脳研究所神経内科学分野

4) 新潟大学脳研究所病理学分野

5) 新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野

研究要旨

我々は、TDP-43 mRNA を定量的に評価できる新規の *in situ hybridization* の手法を用いて、ALS 脊髄運動神経細胞内の TDP-43 mRNA の細胞内局在の解析を行った。その結果、孤発性 ALS において、細胞質内 TDP-43 mRNA 量が増加していることが明らかとなり、孤発性 ALS では TDP-43 の産生が亢進していることが示唆された。

A. 研究目的

ALS は壮年期から中年期にかけて発症し、運動神経細胞死により重篤な筋肉の萎縮と筋力の低下をきたす変性疾患で、数年のうちに呼吸筋麻痺により死亡する疾患である。本疾患のもっとも特徴的な病理所見は核内タンパク質である TDP-43 の核からの消失と細胞外封入体の形成である。ALS の原因遺伝子の一つとして TDP-43 が同定されたことにより、TDP-43 の異常が本疾患発症に一次的に関与することが示された。

TDP-43 は、自身の発現量を厳密に管理・制御する機能を持つことが分かっている。動物モデル研究において、TDP-43 の発現亢進と低下は、共に ALS 病態を引き起こすことから、TDP-43 の量制御の破綻は、細胞にとって非常に有害であり、ALS の発症メカニズムにも強く関与していることが示唆される。しかし、これまでに ALS で特異的に侵される運動神経細胞において TDP-43 の量調節機構が変化しているのかどうかの検証はなされていない。

我々は、これまでに TDP-43 の量調節機構の異常が本疾患の背景に存在すると予想し、その機構

を詳細に明らかにしてきた。TDP-43 は、核内 TDP-43 タンパク質の量に応じた mRNA の polyA 部位選択と、exon6 内のスプライシング、それに伴う mRNA の分解により、調節されている。この調節機構により、TDP-43 は細胞質に移行する mRNA 量を制御し、発現量を調節している。この機構に従うと、細胞ごとに細胞質に存在する mRNA の量比を算出することによって、その細胞の TDP-43 産生レベルを推定できることになる。

近年、*in situ hybridization* によって mRNA 1 コピーを、1 ドットシグナルとして検出可能な新規の手法が開発された。このドットの定量は、高度な定量性を持つことが実験的に示されている。そこで我々は、この手法を用いて ALS 運動神経細胞内の TDP-43 mRNA の局在を定量的に解析することにより、ALS 運動神経細胞の TDP-43 産生レベルを評価することとした。本研究の目的は、上記の解析により、ALS 運動神経細胞において TDP-43 の量調節機構に変動が存在するか否かを検証することである。

B. 研究方法

< ヒト剖検脊髄 FFPE サンプル >

この解析に用いられた、ヒト脊髄 FFPE サンプルは、孤発性 ALS が 10 例、非神経変性疾患コントロール 7 例、ALS1 (SOD1 変異) が 2 例であった。

< in situ hybridization と免疫染色 >

ヒト脊髄 FFPE 切片の in situ hybridization は、affymetrix 社の QuantiGene ViewRNA ISH assay を用いて行った。ヒト FFPE 用のプローブは TDP-43 の Exon3-5 のコーディング領域に設計した。組織は全て、in situ hybridization 後にヘマトキシリンによるカウンター染色を行い、脊髄運動神経細胞の核・細胞質を弁別した。

TDP-43 の免疫染色は、in situ hybridization の隣接切片を用いて行った。抗原不活化は、クエン酸バッファー中でオートクレーブにより行った。免疫染色もヘマトキシリンによる核のカウンター染色を行い、核・細胞質の弁別を行った。

< TDP-43 mRNA ドット計測 >

QuantiGene ViewRNA ISH assay により検出された TDP-43 mRNA のドット数計測は、imaris (Bitplan) ソフトを用いて行った。

ヘマトキシリン染色画像と重ねることにより、核・細胞質領域を弁別し、各々に局在するドット数を計測し、1 細胞当たりの細胞質 mRNA 数比率を算出した。

< TDP-43 タンパク質局在 >

孤発性 ALS 検体では、核に TDP-43 タンパク質の局在を残す神経細胞と、細胞外封入体を形成し、核内 TDP-43 タンパク質が消失した細胞の 2 群に分けて、両者の TDP-43 mRNA 局在を比較した。

(倫理面への配慮)

新潟大学の組換え DNA 実験安全管理規則に従い、学長許可を受けて実施した。

また、ヒト剖検サンプルの取り扱いには、人権・プライバシーの保護に努め、匿名化を厳密に行い遂行した。

C. 研究結果

< コントロール・孤発性 ALS・ALS1 間の TDP-43 mRNA 局在の比較 >

QuantiGene ViewRNA ISH assay による脊髄運動神経における TDP-43 mRNA の定量を行った。各細胞で全コピー数に対する細胞質に存在する TDP-43 mRNA の比率を算出した。コントロール・孤発性 ALS・ALS1 群間で、この TDP-43 mRNA 細胞質比率を比較した結果、孤発性 ALS においてコントロール群との間に有意な増加を認めた。一方で、ALS1 群はコントロール群と同様の細胞質比率を示し、孤発性 ALS に特異な所見であった。また、核・細胞質のドット数の絶対量評価では、有意差は得られなかったものの、孤発性 ALS で細胞質での TDP-43 mRNA の増加が示唆された。そこで、重回帰分析により、核・細胞質・1 細胞当たり存在する TDP-43 mRNA のコピー数に与える要因の影響度の強さを分析した結果、孤発性 ALS であるか否かの要因が細胞質 TDP-43 mRNA 数に最も強い作用を持つことが示された。

< 孤発性 ALS における核内 TDP-43 タンパク質の局在との関連 >

個々の孤発性 ALS 運動神経細胞を免疫染色によって、細胞内 TDP-43 タンパク質の有無で 2 群に分け、この 2 群間で細胞内 TDP-43 mRNA 局在を比較した。その結果、核内に TDP-43 タンパク質を欠く、運動神経細胞群では、TDP-43 タンパク質を核内に保つ群と比較して、細胞質 TDP-43 mRNA の比率が有意に増加していた。

D. 考察

孤発性 ALS の運動神経細胞で細胞質の TDP-43 mRNA 比率が上昇していた結果は、孤発性 ALS の運動神経細胞では TDP-43 の産生が上昇していることを示唆している。TDP-43 病理を示さない ALS1 では、この所見が見られないことから、孤発性 ALS の TDP-43 核外移行の病態との関連が強く示唆される。

さらに、孤発性 ALS の運動神経細胞でも TDP-43 タンパク質を核内から欠いた運動神経細胞で、細胞質 TDP-43 mRNA の増加を認めた。

これらの細胞では、産生された TDP-43 タンパク質は核外封入体にトラップされるなどして、核内に移行できない状態にあると考えられることから、核内 TDP-43 タンパク質は常に不足状態となり、恒常的に TDP-43 自己量調節機構は、発現の亢進に傾き続ける。この悪循環は、さらなる封入体形成を増悪させ続け、病態を悪化させると考えられる。

本研究結果によって、孤発性 ALS には、TDP-43 の自己量調節機構の異常が病態背景に存在することが示唆された。我々はこれまでに、TDP-43 の自己量調節メカニズムを明らかにしている。従って、この機構の制御が、孤発性 ALS の有効な治療標的になりうると期待される。

E. 結論

孤発性 ALS 運動神経細胞では、TDP-43 量調節機構が産生側にシフトしており、タンパク質の発現亢進が存在する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

○ 加藤泰介 小山哲秀 須貝章弘 豊島靖子 柿田明美 高橋均 西澤正豊 小野寺理, 「筋萎縮性側索硬化症運動神経細胞における TDP-43 mRNA の細胞内局在解析」, 平成 26 年度 包括脳ネットワーク冬のシンポジウム, 東京, 2014 年 12 月 11 日~12 月 13 日

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし