

分担研究報告書

モデル動物を用いた孤発性 ALS の治療法開発

研究分担者：郭 伸^{1,2)}

研究協力者：蔡 慧玲¹⁾，寺本さやか¹⁾，山下雄也¹⁾

1) 東京大学大学院医学系研究科臨床医工学部門

2) 国際医療福祉大学臨床医学研究センター

研究要旨

GluA2 Q/R 部位の RNA 編集異常は、孤発性 ALS の運動ニューロンで疾患特異的、部位選択的分子変化であり、RNA 編集酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) の発現低下により引き起こされる。この分子病態を反映するコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) の ADAR2 を欠損する運動ニューロンは、AMPA 受容体の Ca²⁺透過性を亢進させるメカニズムにより細胞死に陥り、その過程で ALS の病理学的指標である TDP-43 病理も観察される。AR2 マウスで AMPA 受容体からの過剰な Ca²⁺流入をブロックすることにより運動ニューロン死が防止できるとともに TDP-43 病理も正常化することから、ADAR2 発現低下により引き起こされる、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体を介する細胞死カスケードを正常化することが ALS の治療法開発の標的となると考えられる。さらに、ADAR2 遺伝子による遺伝子治療、AMPA 受容体アンタゴニストによる薬物治療を AR2 マウスに施すことで、病状の著明な進行抑制が得られ、治療効果評価のパラメーターとして運動機能低下/運動ニューロン死の抑制/抑止に加え TDP-43 局在の正常化が有用であることが示された。

A. 研究目的

孤発性 ALS 脊髄運動ニューロンでは、グルタミン酸受容体である AMPA 受容体の GluA2 サブユニットに、本来生ずべきグルタミン・アルギニン (Q/R) 部位における RNA 編集が行われない mRNA が発現しており(1, 2)、この分子異常は RNA 編集酵素 ADAR2 (adenosine deaminase acting on RNA 2) の発現低下により引き起こされる(3)。Q/R 部位が未編集(グルタミン)の GluA2 をサブユニットに持つ AMPA 受容体は異常に Ca²⁺透過性が高いことが遺伝子改変動物で明らかにされており(4)、ADAR2 を欠損する運動ニューロンは Ca²⁺透過性 AMPA 受容体を介するメカニズムにより緩徐な神経細胞死に陥ることが ADAR2 のコンディショナルノックアウトマウス (AR2) の解析から明らかになっている(5)。この運動ニューロン死を引き起こす分子変化が ALS 運動ニューロンに疾患特異的かつ細胞選択的であり (1-3)、ALS 患者脊髄の観察から ALS の病理学的指標で

ある TDP-43 病理が ADAR2 の免疫活性を失った運動ニューロンにのみ出現することから(6)、ADAR2 発現低下が TDP-43 病理形成に密接に関与している可能性が高い。さらに、TDP-43 病理相同の TDP-43 細胞内局在異常が AR2 マウスの運動ニューロンに観察されることから(7)、Ca²⁺透過性 AMPA 受容体を介する細胞死メカニズムが孤発性 ALS の病因に深く関与していることが予想される。

以上のことは ADAR2 発現低下に始まり Ca²⁺透過性 AMPA 受容体発現に至る分子カスケードが孤発性 ALS 治療の分子標的になる可能性を示唆している(8)。

B. 研究方法

孤発性モデルマウス AR2 を用いて、「ADAR2 の発現低下-カルシウム透過性 AMPA 受容体の異常な活性化」という細胞死カスケードを正常化する事による治療法として、昨年度報告した ADAR2

cDNA の導入(8)、の他に AMPA 受容体アンタゴニスト投与、を試みる。

AMPA 受容体アンタゴニスト X をヘテロ接合体 AR2H、ホモ接合体 AR2 マウスに経口投与する。

1) 2 週間投与

AR2H マウスへは連続 2 週間 (投与開始時 17 週齢)、4 種の用量 (Y mg/kg/day の 1~100 倍量) を投与する (各群 n=3-5)。

2) 90 日間投与

AR2 マウスへは AR2H で得られた有効用量の 2 週間 (投与開始時 17 週齢) ないし 90 日間の投与を行う (投与開始時 26 週齢; 各群 n=3-5)

効果の指標として、2 週間投与群では運動ニューロンの TDP-43 細胞内局在変化、90 日間投与では運動機能低下速度、投与終了時 (39 週齢) の脊髄運動ニューロン数、運動ニューロンの TDP-43 免疫活性の有無、を用いる。

コントロールとして無投与の AR2H、AR2 マウス、野生型同系統マウスを用いる。

(倫理面への配慮)

遺伝子操作に関しては、第二種使用等拡散防止措置における承認を得、全ての遺伝子操作は本学 DNA 組換え実験指針に従い行った。また動物実験については、東京大学医学部動物委員会の承認を得、実験方法については同動物実験指針に従い動物愛護面に十分配慮した。

C. 研究結果

1) アデノ随伴ウイルス (AAV) をベクターとしたヒト ADAR2 cDNA の運動ニューロンへの送達により TDP-43 の細胞局在の著明な改善が観られた。すなわち非投与群 AR2 マウスでは TDP-43 免疫活性を失ったものが大多数を占めたが、投与群ではヒト ADAR2 を発現する運動ニューロンの全てで TDP-43 は核内に局在していた。

2) AMPA アンタゴニスト X の 2 週間投与では、AR2H マウスの何れの用量の投与群でも TDP-43 が核内に局在する運動ニューロンの割合が非投与群に比べ有意に増加していた。その割合は用量依存性の傾向が見られた。AR2 マウスでも

同週齢の非投与群に比べ核内に TDP-43 が局在する運動ニューロンの割合が増加する傾向にあった。

3) AR2 マウスへの 90 日間投与では、投与開始後運動機能低下の抑止ないし運動機能の改善が観察され、エンドポイントにおける脊髄の形態観察では前角細胞数の増加がみられた。TDP-43 の免疫組織化学では残存する運動ニューロンの 90% 以上が染色された。

D. 考察

ADAR2 の遺伝子治療では、AR2 マウスの進行性運動機能低下および運動ニューロン死の抑止とともに外来性 ADAR2 遺伝子発現のみられた運動ニューロンでの TDP-43 の細胞内局在正常化が観察されている(8)。ADAR2 欠損運動ニューロンにおける TDP-43 の局在異常が、過剰な Ca^{2+} 流入によるカルパインの活性化がもたらす TDP-43 の易凝集性断片への切断によるものであることを考えると(7)、今回 AMPA アンタゴニスト X の 2 週間投与で、TDP-43 の細胞内局在を細胞質から核へと正常化する方向の改善がみられたことは、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体障害が有効に働いたことを示唆する。

AR2 マウスにおける 90 日間連続投与では、少数ながら (n=3) 全例に運動機能低下、運動ニューロン脱落の何れも阻止され、殆どの残存運動ニューロンに TDP-43 免疫活性がみられた。このことは、2 週間投与により得られた TDP-43 局在の正常化傾向が正常な細胞内局在を維持することによる運動ニューロン死およびそれに起因する運動機能低下を完全に阻止し得たことを意味している。

この結果から「ADAR2 の発現低下-カルシウム透過性 AMPA 受容体の異常な活性化」という分子異常カスケードが ALS の治療標的になり得ること、TDP-43 の細胞内局在の正常化が治療評価に有用なバイオマーカーになることが示された。

E. 結論

ADAR2 の発現低下による細胞死カスケードが孤発性 ALS の病因メカニズムに働いている、とする我々の仮説が正しければ、今回モデルマウスに用いたと同様の方法により孤発性 ALS の治療

が原理的に可能である。また、今回の方法以外の治療法開発において AR2 マウスは有用なツールになることを示している。

参考文献

1. Kawahara Y, *et al.* Nature 427, 801, 2004.
2. Takuma H, *et al.* Ann Neurol 46, 806-815, 1999.
3. Hideyama T, *et al.* Neurobiology of disease 45, 1121-1128, 2012.
4. Feldmeyer D, *et al.* Nat Neurosci 2, 57-64, 1999.
5. Hideyama T, *et al.* J Neurosci 30, 11917-11925, 2010.
6. Aizawa H, *et al.* Acta Neuropathol 120, 75-84, 2010.
7. Yamashita T, *et al.* Nat Commun 3, 1307, 2012.
8. Yamashita T, *et al.* EMBO Mol Med 5, 1710-1719, 2013.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sasaki S, Yamashita T, Hideyama T, Kwak S: Unique nuclear vacuoles in the motor neurons of conditional ADAR2-knockout mice. *Brain Res* 1550:536-546, 2014.
2. Yamashita T, Kwak S: The molecular link between inefficient GluA2 Q/R site-RNA editing and TDP-43 pathology in motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain Res* 1584: 28-38, 2014.
3. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズム. *Dementia Japan* 28: 307-318, 2014.
4. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 のカルパイン依存性断片化の意義. *臨床神経学* 54: 1151-1154, 2014.

2. 学会発表

1. Kwak S: ADAR2 down-regulation, a pathogenesis of ALS and a target for therapy. RNA editing workshop, Israel Des 7-10, 2014.
2. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S, Kwak S: Gene therapy for sporadic ALS using an intravenous injection of AAV vector. The 25th International Symposium on MND/ALS, Brussels, 5-7 Des, 2014.
3. Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Tsuji S, Shimazaki K, Muramatsu S-I, Kwak S: Mechanism-based gene therapy for ALS using sporadic ALS model mice. The 45th Annual Meeting Society for Neuroscience Washington DC, 15-19 Nov, 2014.
4. Kwak S, Yamashita T, Chai HL, Teramoto S, Muramatsu S-I: Development of a gene therapy for sporadic ALS by normalizing ADAR2 activity in the motor neurons using a vascular type AAV vector. The 24th Meeting of the European Neurological Society. Istanbul, Turkey, May 31-June 3, 2014.
5. 郭 伸: AAV-ADAR2 による ALS の遺伝子治療. シンポジウム「AAV ベクターを応用した神経・精神疾患の病態解明」第 36 回日本生物学的精神医学会, 第 57 回日本神経化学会大会, 奈良, September 29 - October 1, 2014.
6. 郭 伸: 分子病態モデルマウスを用いた筋萎縮性側索硬化症の遺伝子治療法開発. 第 5 回東京 ALS フォーラム, 東京, August 23, 2014.
7. 蔡 慧玲, 山下雄也, 郭 伸. ペランパネルは ALS モデルマウス運動ニューロンの TDP-43 病理を軽減する. 第 37 回日本神経科学大会 Neuro2014, 横浜, パシフィコ横浜, September 11-13, 2014.
8. 山下雄也, 蔡 慧玲, 寺本さやか, 辻 省次, 島崎久仁子, 村松慎一, 郭 伸. 孤発性 ALS モデルマウスを用いた ALS の遺伝子治療法開発の試み. 第 37 回日本神経科学大会 Neuro2014, 横浜, パシフィコ横浜, September 11-13, 2014.
9. Akamatsu M, Takuma H, Yamashita T, Okada T, Masu-Keino K, Oehring H, Kwak S, Masu M,

Jirikowski FG: Electron microscopic observation of intranuclear aggregation of TDP-43 in mouse cerebral cortex produced by in utero electroporation. 第37回日本神経科学大会 Neuro2014, 横浜, パシフィコ横浜, September 11-13, 2014.

10. 肥田あゆみ, 井上真奈美, 前田明子, 山下雄也, 郭 伸, 辻 省次, 清水 潤: 筋炎と悪性腫瘍との関連に関する疫学的検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 福岡国際会議場, May 21-24, 2014.
11. 澤田 潤, 相澤仁志, 浅野目明日香, 高橋佳恵, 斎藤 司, 片山隆行, 山下雄也, 郭 伸, 長谷部直: AMPA 受容体サブユニット GluA2 の Q/R 部位 RNA 編集率に対する薬剤の効果. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 福岡国際会議場, May 21-24, 2014.
12. 詫間 浩, 赤松 恵, 山下雄也, Hartmut, Oehring, 岡田拓也, 枡 和子, 石井一弘, Gustav Jirikowski, 郭 伸, 枡 正幸, 玉岡 晃: 子宮内電気穿孔法 TDP-43 遺伝子導入による in vivo 形成封入体の微細形態の検討. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 福岡国際会議場, May 21-24, 2014.
13. 山下雄也, 郭 伸: TDP-43 病理形成メカニズムにおける TDP-43 のカルパイン依存性断片化の意義. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 福岡国際会議場, May 21-24, 2014.
14. 郭 伸, 山下雄也, 蔡 慧玲, 寺本さやか, 辻 省次, 島崎久仁子, 村松慎一: 分子病態に基づいた孤発性 ALS の遺伝子治療法の開発. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 福岡国際会議場, May 21-24, 2014.

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

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

研究分担者：梶 龍兒

研究協力者：瓦井俊孝¹⁾、森垣龍馬²⁾、小泉英貴¹⁾、沖 良祐¹⁾、和泉唯信¹⁾、後藤 恵²⁾

1) 徳島大学大学院 HBS 臨床神経科学

2) 徳島大学大学院 HBS 先端運動障害治療学講座

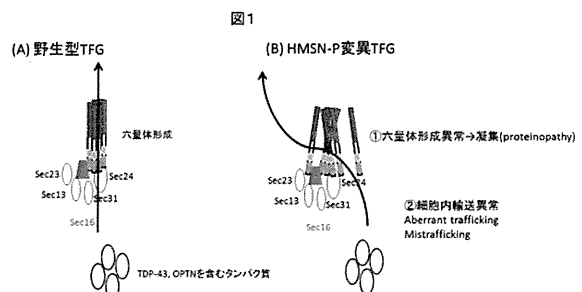
研究要旨

TRK-fused gene (TFG)変異により生じる運動ニューロン死のメカニズムを明らかにする目的で、トランスジェニックマウスを作製し、解析を行った。ハムスタープリオン遺伝子プロモーターの下流にヒト TFG cDNA を持つトランスジェニックマウスでは、中枢神経にヒト TFG 蛋白質を発現していることを確認した。12 週齢まで観察したが、発育、筋力において非トランスジェニックマウスと有意差は認めなかった。今後、病理学的評価、生化学的評価を行い、TFG 病理の再現、メカニズムを解明する予定である。

A. 研究目的

2012 年に、沖縄と滋賀県に存在する近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチー(Hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement; 以下 HMSN-P)2 家系において、TFG にミスセンス変異 P285L が発見された。その後、同じ変異が韓国の家系でも見つかった。Arg106Cys (R106C)のホモ接合性変異が視神経萎縮、末梢神経傷害を伴う劣性形式をとる家族性痙攣性対麻痺(HSP)症例で発見された。さらに、台湾において、優性遺伝形式をとる Charcot-Marie-Tooth 病(CMT)2 型において、Gly269Val 変異が報告された。我々は、孤発例筋萎縮側索硬化症(ALS)症例において、スクリーニングしたところ、2 例において Gln294His, Arg360Lys のミスセンス変異を発見した。こうしたことより、変異 TFG により、上位運動ニューロンあるいは下位運動ニューロン、あるいは両方において神経変性が生じることが判明している。病理学的な検索は、HMSN-P-P285L 変異をもつ患者でのみ行われており、主要所見として、①細胞内凝集体が認められ、抗 TFG・OPTN・TDP-43・ユビキチン抗体に対して免疫反応を示す、②ゴルジ体の断片化、③下位優位の運動および感覚ニューロンの障害(neuronopathy)である。

また、培養細胞に P285L-TFG を培養細胞に発現させたところ、TDP-43 の細胞内局在の変化が認められた。さらに、ALS 患者で認められた変異を培養細胞に発現させたところ、ALS 蛋白質の一つである FUS の細胞内局在に変化が認められた。判明している変異が全てミスセンス変異であること、病理学的所見、培養細胞での機能解析より単純なハプロ不全が病態ではなく、①蛋白凝集(proteinopathy)および②細胞内蛋白輸送異常(aberrant trafficking, mistrafficking)が病態の一つではないかと考えた(図1)。



興味深いことに、ALS 関連タンパクである TDP-43, FUS の細胞内動態にも影響を及ぼしていること、TFG 変異により、HMSN-P, HSP, CMT, ALS といった運動ニューロン疾患を発症することより、TFG pathology の解明は、ALS といった運動ニューロン病の病態解明にも役立つ。我々は、ヒト変異 TFG(P285L)を神経組織に於いて過剰に

発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析を行った。

B. 研究方法

ヒト大脳cDNAライブラリーよりPCR法により最長アイソフォームのTFG cDNAをクローニングし、HMSN-P変異P285Lを導入、さらにハムスタープリオンプロモーターの下流に繋げたトランスジーンを作製し、マウス受精卵にinjectionを行った。対照としてヒトwild TFGも過剰発現するトランスジェニックマウスの作製も行った。

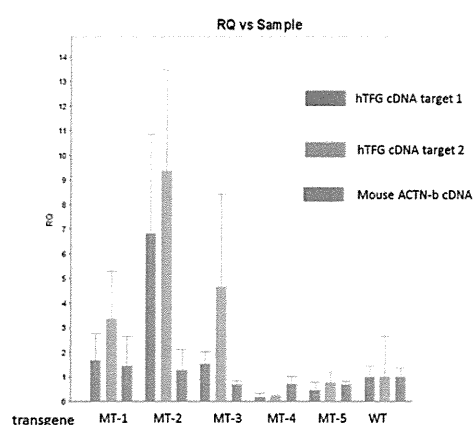
生まれたトランスジェニックマウスに対して、トランスジーンのコピー数の評価を定量PCRで行った。さらにウェスタン解析、免疫組織学的検索を行い、ヒトTFG蛋白の発現を評価した。並行して、マウスの理学的所見の評価、行動解析も行った。

(倫理面への配慮)

「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」ならびに「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等に第二種使用等にあたって執るべき拡散阻止措置等を定める省令」を遵守するこの研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会において承認を受けた。適切な拡散防止措置が取られている。マウス実験計画は、徳島大学ヘルスバイオサイエンスセンターの動物実験委員会で承認されている。

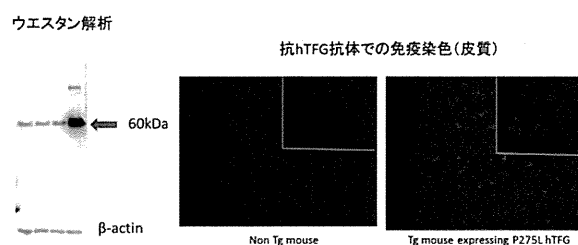
C. 研究結果

マウスハウスキーピング遺伝子であるアクチンベータ(ACTN-b)を基準にhTFGのトランスジーンコピー数を評価した。1コピーから18コピーまでのトランスジーンがマウス染色体に統合(integration)されていることが分かった(図2)。



生まれたトランスジェニックマウスを12週齢まで観察したが、体重、筋力において、野生型ヒトTFG発現マウスと変異ヒトTFG発現マウスにおいて有意差は認めなかった。ウェスタン解析では、ヒトTFG蛋白の過剰発現を確かめ、さらにヒトTFG特異抗体を使った免疫組織学的解析により神経細胞の細胞質に発現していることを確認した(図3)。

図3



D. 考察

12週齢において、ヒト変異TFGによる病的な影響は確認できなかった。凝集体形成や神経細胞の脱落などの変化は、早期には認められないことを確認した。

E. 結論

ヒトTFGを過剰に発現するトランスジェニックマウスの作製に成功した。今度、アダルトマウスにおいて、予想される病的な変化が出現しないか、評価する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawarai T, Morita M, Morigaki R, Fujita K, Nodera H, Izumi Y, Goto S, Nakano I, Kaji R. Pathomechanisms of motor neuron death by mutant TFG. *Rinsho Shinkeigaku* 2013;53(11):1199.

Hiroyuki Ishiura, Wataru Sako, Mari Yoshida, Toshitaka Kawarai, Osamu Tanabe, Jun Goto, Yuji Takahashi, Hidetoshi Date, Jun Mitsui, Budrul Ahsan, Yaeko Ichikawa, Atsushi Iwata, Hiide Yoshino, Yuishin Izumi, Koji Fujita, Kouji Maeda, Satoshi Goto, Hidetaka Koizumi, Ryoma Morigaki, Masako Ikemura, Naoko Yamauchi, Shigeo Murayama, Garth A. Nicholson, Hidefumi Ito, Gen Sobue, Masanori Nakagawa, Ryuji Kaji and Shoji Tsuji. The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P). *Am J Hum Genet* 2012; 91(2) 320-329

瓦井俊孝 新規運動ニューロン病遺伝子 TFG の機能解析 *ブレインサイエンス・レビュー2015* (公財)ブレインサイエンス振興財団 2015年2月10日発行

瓦井俊孝, 森垣龍馬, 沖 良祐, 和泉唯信, 後藤 恵, 梶 龍兒 ALS and TFG *神経内科* 2015 印刷中

瓦井俊孝、森垣龍馬、藤田浩司、和泉唯信、梶龍兒 近位筋優位遺伝性運動感覚ニューロパチーの分子病態機序 *神経内科* 79(6) 751-756 2013

藤田浩司、瓦井俊孝、和泉唯信、後藤 恵、梶龍兒 近位筋優位運動感覚ニューロパチーの臨床的特徴 *神経内科* 79(6): 732-737, 2013

2. 学会発表

WFN Research Group on Motor Neuron Diseases and Amyotrophic Lateral Sclerosis Workshop, Chicago April 12.2012, Sheraton

Chicago Hotel & Towers

梶 龍兒、森田光哉、瓦井俊孝、森垣龍馬、藤田浩司、野寺裕之。和泉唯信、後藤 恵、中野今治 TFG 変異による運動ニューロン死のメカニズム *第54回日本神経学会学術大会 2013*

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

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

研究分担者：加藤信介¹⁾

研究協力者：加藤雅子²⁾，瀧川みき¹⁾，伊井真広¹⁾，内藤善哉³⁾，田中信之⁴⁾

1) 鳥取大学医学部病理学講座脳病態医科学分野

2) 鳥取大学医学部病理学講座分子病理学分野

3) 日本医科大学病理学統御機構・腫瘍学講座

4) 日本医科大学老人病研究所遺伝子制御学講座

研究要旨

2-デオキシ-D-グルコース(2-Deoxy-D-glucose: 2DG)を、ALS モデル動物である G93A 点変異のヒト変異 SOD1 遺伝子を高コピー数 (25 コピー) 過剰発現させたトランスジェニックマウス B6SJL-TgN [SOD1-G93A] 1Gur (G1H-G93A トランスジェニックマウス) に、ALS 発症を確認後より薬剤を 1 mg 2DG/1g マウス体重を連日経口投与した。プラセボとして 2DG の溶剤として使用したマウス用飲料水とした。薬剤の中核的効果判定である病悩期間と生存期間の延長効果に関しては、2DG は、プラセボより、有意な病悩期間延長効果を認める (P<0.05、Kaplan-Meier 法 Log-rank 検定) と共に、生存期間延長効果も認めた (P<0.05、Kaplan-Meier 法 Log-rank 検定)。この事実は国内・外の ALS 新規治療薬開発における画期的発見といえる。

A. 研究目的

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) は、進行性の原因不明の疾患であり呼吸筋麻痺により死亡する致死性運動ニューロン疾患として位置づけられ、有効な治療法確立が強く希求されている致死性神経変性疾患の代表である。現在、ALS 治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアゴニストとしてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールのみである。しかしながら、リルゾールのみでは ALS に対する治療効果は十二分とはいえ、さらに新たな ALS 治療薬の開発が強く望まれている。かかる実状において、我々は、ヒト変異 SOD1 過剰発現トランスジェニックマウスを使用し、日本・米国・欧州において特許取得を終了した非プリン型 XOR 阻害剤 ALS 治療薬の開発過程において、全く意外にも、2DG が、顕著に優れた ALS 治療作用を示すことを見出した。そこで、当該化合物を特徴とする ALS 治療薬の開発とその基盤研究を研究目的とする。

B. 研究方法

I. 材料及び方法

1. 薬剤

1) 薬剤として、2-デオキシ-D-グルコース (2-Deoxy-D-glucose: 2DG) を使用した。

2) プラセボとして、マウス用飲料水を使用した。マウス用飲料水に関しては、ヒト飲料水である上水道の水を、濾過精度 0.5 μm のフィルター(メーカー：アイオン、商品名：KANEFIEL、型番：FD-005) を使用して、濾過した後の水を、マウス用飲料水としている。マウス用飲料水の塩素濃度については、ヒト飲料水用上水道と同一として、遊離残留塩素濃度 0.1~0.2 mg/l となるように定期的に測定している。

2. 投与方法

1) 2DG の濃度調整と投与量・投与方法は次の要領で行った。

溶剤として、マウス用飲料水を使用した。2DG 投与薬剤の調整は、薬剤にまず少量のマウス用飲

料水を加え、薬剤を溶解させる。その後、徐々に少量のマウス用飲料水を加え、最終的に1 mg 2DG/0.01 mlマウス用飲料水/マウス体重1gに相当するように完全に溶解させる。具体的には、マウスの体重が20 gであれば、20 mgの2DGを0.2 mlのマウス用飲料水に溶解させ、経口投与量が0.2 mlなるように調整した。溶解するバイアル瓶に付着して減少する分を考慮し、毎日投与直前に、500 mgの2DGを5 mlのマウス用飲料水で溶解した。そのうち、必要投与量を使用した後の薬剤は廃棄した。2) プラセボとしてのマウス用飲料水に関しては、薬剤投与マウスの溶剤と等容量とした。3) 経口投与の方法は、プラスチックシリンジにて個々のマウスの体重に相当する薬剤を含有する容量を正確に測定し、プラスチックシリンジにマウス用胃ゾンデをつなげ、経口・経食道的に確実に投与した。投与は、1日1回午前中に実施した。

3. 実験動物

ALSモデル実験動物には、G93A点変異のヒト変異SOD1遺伝子を高コピー数(25コピー)過剰発現させた雄トランスジェニックマウスB6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur(G1H-G93A, JR2726; Hemizygote)をJackson Laboratory(Bar Harbor, 米国)から購入し、使用した。同時に、その雄の野生型同腹仔マウスB6SJL-TgN[SOD1-G93A]1Gur(Wild type)もJackson Laboratoryから購入し、使用した。

II. プラセボ・2DG投与方法による実験グランドデザイン

自然定着の微生物を保有するマウスにおける感染症等を排除し、可能な限り、個体差を最小限にさせる目的で、当該G1H-G93Aトランスジェニックマウス及び野生型同腹仔マウスを、Jackson Laboratoryから購入後、マウス1個体ごとに4週間隔離し、SPF(specific pathogen free: 特定病原体のいない微生物制御状態)であることを再度確認する。実験は、SPFを再度確認した後、当該G1H-G93Aトランスジェニックマウス10匹を5匹ずつ2群に分けた。即ち、コントロール群(n=5)であるマウス用飲料水投与群と治療群である2DG治療投与群(n=5)の2群とした。

G1H-G93AトランスジェニックマウスにおけるALSとしての自然臨床経過は、ほぼ単一的な自然臨床経過であって、以下のごとくのALS臨床経過をとった。即ち、G1H-G93Aトランスジェニックマウスは、しばらくの間は、野生型同腹仔と同一俊敏性の行動が認められている。しかし、生後100日齢を過ぎた頃より、個体により、多少の差はあるものの、次のような臨床症状を呈し始めた。即ち、不活発性・小刻みなふるえ(jittering/tremor)・尻尾挙上不全(limp tail)・俊敏性の欠如した緩徐歩行・一側性の極めて軽度の後肢不完全麻痺のいずれか一つ以上の臨床症状を呈した。これらの臨床症状の一つ以上を認めた場合をステージ1度の臨床症状と定義づけた。それ以後のG1H-G93Aトランスジェニックマウスにおける自然臨床経過は、前肢は麻痺のない正常にもかかわらず、明らかな一側あるいは両側の後肢不完全麻痺を呈する臨床症状を示し始めた(ステージ2度)。その後、前肢はほぼ正常のまま、後肢は高度の両側麻痺を呈するようになった(ステージ3度)。そして、両側後肢高度麻痺を呈したまま、一側あるいは両側の前肢不完全麻痺を発症し始めた(ステージ4度)。やがて、全てのG1H-G93Aトランスジェニックマウスは終末期を迎えることになった。即ち、最終的には、G1H-G93Aトランスジェニックマウスは高度四肢麻痺もしくは瀕死状態の臨床症状を示し始めた(ステージ5度)。また、野生型同腹仔マウスは、1歳齢まで観察しても、ALS臨床症状を発症しなかった。

当該研究の実験グランドデザインは、ALSの臨床症候の確認をもって治療薬の投与を開始する実際のヒトにおける臨床試験方法を考慮して、G1H-G93Aトランスジェニックマウスの投与方法をグランドデザイン化した。

1. プラセボ投与実験群

同一出生日のG1H-G93Aトランスジェニックマウス5匹と野生型同腹仔マウス10匹とを使用した。G1H-G93Aトランスジェニックマウス5匹のそれぞれの個体が、ALS症状の発症後、即ち、臨床症状ステージ1度を確認の後、この確認時点を含む日よりプラセボであるマウス用飲料水を経口投与した。野生型同腹仔マウス10匹全例は、ALS症状

は認めないために、野生型同腹仔マウスは10匹全例100日齢から投与した。経口投与期間は、G1H-G93Aトランスジェニックマウス5匹においては、臨床症状ステージ1度を確認した日から、四肢麻痺となる人道的エンドポイントの時期まで連日投与した。野生型同腹仔マウス10匹は、プラセボであるマウス用飲料水を100日齢から、2DG投与G1H-G93Aトランスジェニックマウス治療実験群のマウス個体うち、最長延命可能であったマウス個体の最長日齢まで連日経口投与した。

2. 2DG投与治療実験群

同一出生日のG1H-G93Aトランスジェニックマウス5匹を使用した。G1H-G93Aトランスジェニックマウス5匹のそれぞれの個体が、ALS症状の発症後、即ち、臨床症状ステージ1度を確認の後、この時点を含む日より2DGを経口投与した。経口投与期間は、G1H-G93Aトランスジェニックマウス5匹においては、臨床症状ステージ1度を確認した日から、人道的エンドポイントの時点まで連日投与した。

当該研究の実験グランドデザインは、ALSが発症をもって治療薬の投与を開始する実際のヒトにおける臨床試験方法を考慮して、G1H-G93Aトランスジェニックマウスの投与方法をグランドデザイン化した。ALS症状の発症後、即ち、臨床症状ステージ1度を確認の後、この時点を含む日より2DG投与治療実験群には1 mg 2DG/0.01mlマウス用飲料水/マウス体重1gを胃ゾンデにて連日経口投与した。マウス用飲料水コントロール群にはマウス用飲料水のみを胃ゾンデを用いて連日経口投与した。

III. 実験動物のサンプリング

2DG投与G1H-G93Aトランスジェニックマウス治療実験群、マウス用飲料水投与G1H-G93Aトランスジェニックマウスコントロール群、マウス用飲料水投与野生型同腹仔マウス正常対照群の各群のそれぞれの個体について、上述してある2DGあるいはマウス用飲料水投与期間についての当該実験最終日において、実験動物のサンプリングを実施した。即ち、2DG投与G1H-G93Aトランスジェニックマウス治療実験群の5匹、マウス用飲料水投与G1H-G93Aトランスジェニックマウスコント

ロール群の5匹、マウス用飲料水投与野生型同腹仔マウス正常対照群の10匹の合計20匹を当該実験に供した。

20匹の各個体の臓器組織のサンプリング方法は、以下のごとく実施した。

10匹のG1H-G93Aトランスジェニックマウス及び10匹の野生型同腹仔マウスは個体体重1 kg当たり30 mgのペントバルビタールナトリウム（商品名ネンプタール、CAS登録番号57-33-0、大日本住友製薬、大阪）の腹腔内注射にて、全身麻酔を施行した。完全に麻酔下にあることを確認した。その後、麻酔下にある各マウス個体は更に二酸化炭素処理による安楽死後、開腹・開胸を行った。左心室の大動脈経由により、生理的食塩水にて全身臓器の血液を除去した。脳と脊髄は、4%パラホルムアルデヒド・0.1Mカコジル酸緩衝液（pH7.3）にて、直ちに浸潤固定した。

V. 統計解析法

病悩期間日数（発症日を含め、人道的エンドポイントに至るまでの日数）及び生存期間日数（人道的エンドポイントに至るまでの日数）の定量的数値は、平均値±標準偏差で表示した。すべての統計解析はマッキントッシュソフトウェアのStatview(Ver.5.0,SAS Institute Inc.,カリフォルニア、米国)を用いて実施した。有意差検定にはKaplan-Meier法のLog-rank検定を用い、危険率 $P < 0.05$ を持って統計的有意差があると判定した。（倫理面への配慮）

本研究は鳥取大学動物実験委員会の承認を得ている（承認番号12-Y-34）。

C. 研究結果

I. プラセボ投与野生型同腹仔マウス実験群の臨床結果

マウス用飲料水投与野生型同腹仔マウスは、ALS臨床症状を発症しなかった。

II. プラセボ投与G1H-G93Aトランスジェニックマウス実験群の臨床結果

マウス用飲料水投与実験群におけるG1H-G93Aトランスジェニックマウスの発症日は、 105.2 ± 0.4 日、生存期間は、 123.0 ± 3.7 日、病悩期間 18.8 ± 3.6 日であった。

III. 2DG投与G1H-G93Aトランスジェニックマウス実験群の臨床結果

2DG投与実験群におけるG1H-G93Aトランスジェニックマウス治療実験群の発症日は、105.2±0.4日、生存期間137.6±3.4日、病悩期間33.2±3.1日であった。

IV. プラセボ投与実験群と2DG投与実験群との比較による2DGの有効性の解析結果

G1H-G93Aトランスジェニックマウスに、ALS発症と同時に、1 mg 2DG/0.01 mlマウス用飲料水/マウス体重1 gを連日経口に投与することにより、Kaplan-Meier法のLog-rank検定による解析を施行したところ、マウス用飲料水投与プラセボ群より、病悩期間を有意に延長させる病悩期間延長効果 (P<0.05) と生存期間を有意に延長させる生存期間延長効果 (P<0.05) を認めた。即ち、2DG経口投与によって、病悩期間延長効果と生存期間延長効果の各効果の明らかな有効性を認めた。

D. 考察

ALSは、有効な治療法確立が強く希求されている致死的神経変性疾患の代表であり、ALSの有病率は10万人口当たり約3人から5人とされ、現在日本では約5,000から7,000人の患者がいると考えられている。尚かつ、本疾患は働き盛りである中年以降に発症する。現在、最も有効なALSの対症療法は人工呼吸による延命措置のみである。しかし、人工呼吸器の装着後の患者および患者家族における経済的・精神的・肉体的負担は極めて大きい。従って、ALSの新規治療法の開発は、喫緊の重要課題である。

歴史的には、ALSは1869年にCharcotとJoffroyにより記載された一つの疾患単位である。主に上位運動ニューロンと下位運動ニューロンの両者が障害される進行性の原因不明の疾患であり呼吸筋麻痺により死亡する運動ニューロン疾患として位置づけられる。この疾患が初めて記載されて以来、約140年経過した現在尚、その真に有効な治療法は確立していない。治療剤として神経栄養因子、神経保護効果、カスパーゼ抑制、銅キレート作用、グルタミン酸抑制作用、抗酸化剤等に基づいた薬剤の効果についての検討がなされ、一定

の効果は認められている。しかし、現在、ALS治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアゴニストとしてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールのみである。しかしながら、リルゾールのALSに対する治療効果は十二分とはいえず、さらに新たなALS治療薬の開発が望まれている。かかる現状において、全く意外にも、我々は、2DGが顕著に優れたALS症状抑制効果を示すことを見出した。

現実の医療現場では、ALS治療の開始決定は、ALSの臨床診断後からである。そこで、我々は実際の臨床応用を念頭に入れて、ALSモデル動物のALS症状確認後において、2DGの経口治療薬投与実験を実施した。2DGによるALS症状抑制効果を示すことを、ALS動物モデルを用いたALS症状発症後実験の結果から示した意義は極めて大きいと我々は考えている。我々は、現実的な臨床応用を念頭に入れた2DGによるALS新規経口治療薬開発は喫緊の重要な課題と考えている。

E. 結論

2DGは、筋萎縮性側索硬化症治療薬の可能性が極めて高い。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kato S, Takikawa M, Ishihara S, Yokoyama A, Kato M: Pathologic reappraisal in Wallenberg syndrome: pathologic distribution study and literature Analysis. *Yonago Acta med.* 57: 1-14, 2014.
- 2) Yokoyama A, Ohno K, Hirano A, Shintaku M, Kato M, Hayashi K, Kato S: Cerebellar expression of copper chaperone for superoxide, cytosolic Cu/Zn-superoxide dismutase, 4-hydroxy-2-nonenal, acrolein and heat shock protein 32 in patients with Menkes Kinky hair disease: immunohistochemical study. *Yonago Acta med.* 57: 23-35, 2014.

2. 著書

- 1) 加藤信介、瀧川みき (分担執筆) : 大脳の主要な構成とその機能 神経機能解剖テキスト(編集者: 浦上克哉、北村 伸、小川敏英), 文光堂, 東京, 2014. 印刷中

3. 学会発表

- 1) 隅寿恵、別宮豪一、加藤信介、伊藤朝子、山寺みさき、藤村晴俊、佐古田三郎、望月秀樹 : SOD1 遺伝子変異 (C111Y) を有する ALS1 症例の一次運動ニューロンにおける TDP-43 の細胞内局在変化について. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、6 月 5-7 日、2014.
- 2) 加藤信介、瀧川みき、加藤雅子、草野輝男、西野武士 : 非プリン型キサンチン酸化還元酵素阻害剤経口投与による ALS 抑制の病態解明に関する研究. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、6 月 5-7 日、2014.
- 3) 隅寿恵、別宮豪一、伊藤朝子、新沢康英、加藤信介、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹 : PLA2G6 遺伝子欠損マウスのドパミン作動性神経系における神経軸索ジストロフィー. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、6 月 5-7 日、2014.
- 4) 足立正、宮田元、中野俊也、足立芳樹、加藤信介、中島健二 : CSF1R 新規変異 R579W を伴う hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroids 兄妹剖検例. 第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会、東京、6 月 5-7 日、2014.
- 5) 隅寿恵、別宮豪一、新沢康英、加藤信介、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹 : PLA2G6 ノックアウトマウス脊髄では早期から LC3 が小胞に高発現する. 第 8 回 日本パーキンソン病・運動障害疾患学会、京都、10 月 4 日、2014.
- 6) 隅寿恵、別宮豪一、伊藤朝子、新沢康英、加藤信介、辻本賀英、佐古田三郎、望月秀樹 : PLA2G6 遺伝子欠損マウスの線条体における変性軸索の形態学的解析. 第 55 回日本神経学会学術大会、福岡、5 月 24 日、2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称 : 筋萎縮性側索硬化症治療薬(特許取得)
出願国 : 日本
特許番号 : 第 5110536 号
特許登録日 : 2012 年 10 月 19 日
発明者 : 加藤信介, 西野武士, 阿部靖子
特許権者 : 国立大学法人鳥取大学, 学校法人日本医科大学
 - 2) 発明の名称 : THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS(特許取得)
出願国 : 米国
特許番号 : 第 8318792 号
発明者 : 加藤信介, 西野武士, 阿部靖子
特許登録日 : 2012 年 11 月 27 日
特許権者 : 国立大学法人鳥取大学, 学校法人日本医科大学
 - 3) 発明の名称 : THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS(特許取得)
出願国 : EPC(欧州特許条約)
特許番号 : 第 2050467 号
発明者 : 加藤信介, 西野武士, 阿部靖子
特許登録日 : 2014 年 9 月 10 日
出願人 : 国立大学法人鳥取大学, 学校法人日本医科大学
公開番号 : EP2050467
 - 4) 発明の名称 : 筋萎縮性側索硬化症治療薬(特許出願中)
発明者 : 加藤信介, 西野武士, 阿部靖子
出願人 : 国立大学法人鳥取大学, 学校法人日本医科大学
出願国 : PCT
出願番号 : PCT/JP2007/000765
出願日 : 2007 年 7 月 13 日
公開番号 : WO2008/010315
公開日 : 2008 年 2 月 5 日
- ## 2. 実用新案登録
- 該当なし

分担研究報告書

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

研究分担者：加藤丈夫¹⁾

研究協力者：佐藤秀則¹⁾、小山信吾¹⁾、荒若繁樹¹⁾、和田学¹⁾、川並透¹⁾、
江見充^{1,2)}、豊島至³⁾、祖父江元⁴⁾、松原健一²⁾

- 1) 山形大学第三内科
- 2) DNA チップ研究所
- 3) 国立病院機構あきた病院
- 4) 名古屋大学医学部神経内科

研究要旨

Isopentenyl diphosphate isomerases 1 & 2 (IDI1-2) 遺伝子および protein convertase subtilisin/kexin type 6 (PCSK6) 遺伝子のコピー数多型(CNV)は、孤発性 ALS (SALS) に有意に関連していることを報告してきた。今回、SALS 32 例の臨床情報を用いて、IDI1-2 遺伝子および PCSK6 遺伝子の CNV と神経学的所見との関連の有無を解析した。その結果、PCSK6 遺伝子の CNV 異常をもつ症例では線維束性収縮が認められる頻度が有意に高かった。

A. 研究目的

これまでに孤発性 ALS(SALS)の疾患感受性遺伝子（リスク遺伝子）として、isopentenyl diphosphate isomerases 1 & 2 (IDI1-2)遺伝子や protein convertase subtilisin/kexin type 6 (PCSK6)遺伝子のコピー数多型(copy number variation: CNV) (copy number gain or loss) について報告してきた。本研究では、これらの CNV と臨床所見との関連について検討した。

B. 研究方法

Agilent oligonucleotide Array 解析 (60K あるいは 400K)を行った SALS 32 例(山形/秋田症例 20 例、名古屋症例：12 例)において、臨床調査票にて発症時期、生活習慣（喫煙・飲酒）、初発症状（構音障害・嚥下障害・上下肢の脱力/筋萎縮）、入院時所見（球麻痺[舌萎縮、舌線維束性収縮、構音障害、嚥下障害]・上下位ニューロン徴候等 [上位：痙縮、腱反射亢進、病的反射、下位：筋萎縮、筋力低下、線維束性収縮])について、IDI1-2 and/or PCSK6 の CNV の有無との関連について数理統計的な解

析(Cochran-Armitage 検定、Wilcoxon signed-rank 検定、Fisher's Exact 検定)を行った。（倫理面への配慮）

本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）、疫学研究に関する倫理指針（平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、臨床研究に関する倫理指針（平成 16 年厚生労働省告示第 459 号）等に則り、さらに山形大学医学部倫理審査委員会の承認を得て行なった。研究対象者からは文書で同意を取得後、末梢血の採取を行なった。検体採取時の苦痛はほとんどない。

C. 研究結果

SALS 32 例において入院時所見と CNV との関連を検討した結果、PCSK6 遺伝子の CNV の有無と線維束性収縮の有無の間には有意な関連が認められ、PCSK6 遺伝子の 3'領域の segmental copy number loss をもつ症例では線維束性収縮が認め

られる頻度が高かった (図 1) ($p=0.013$).

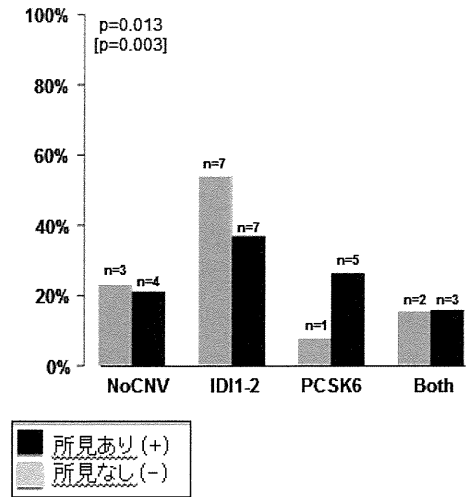


図 1 : PCSK6 遺伝子の copy number loss を有している症例では、線維束性収縮を認める症例が多い傾向を認めた。

D. 考察

PCSK6 遺伝子産物である PCSK6 蛋白質は、pro-neurotrophin (proNT) や pro-nerve growth factor (proNGF) を成熟型の NT や NGF に変換する酵素であり、NT や NGF は Trk 受容体を介して神経細胞の生存や突起伸長に促進的に作用することが知られている (図 2)。一方、proNT や proNGF は p75NTR 受容体を介して神経細胞のアポトーシスを誘導する (図 2)。

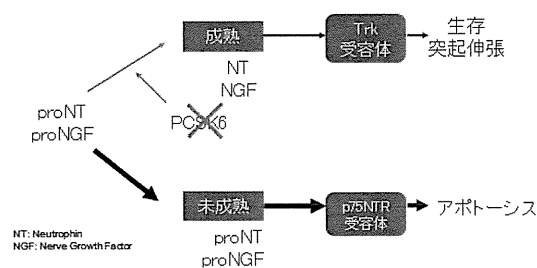


図 2 : PCSK6 遺伝子の copy number loss により PCSK6 蛋白質の発現量が減少し、相対的に proNT や proNGF が増加し、p75NTR 受容体を介する代謝経路が優位になり、神経細胞のアポトーシスが誘導される可能性が推察される。

SALS で高頻度に認められた PCSK6 遺伝子の segmental copy number loss は 3'領域の exon を含んでおり、これにより PCSK6 蛋白質の発現量

が減少し、相対的に proNT や proNGF が増加し、p75NTR 受容体を介して神経細胞のアポトーシスが誘導されることが推測される。しかし、PCSK6 遺伝子の segmental copy number loss により、なぜ線維束性収縮の頻度が高くなるのか、その病態機序は不明であり、今後の課題である。

E. 結論

PCSK6 遺伝子の 3'領域の segmental copy number loss をもつ症例では線維束性収縮が認められる頻度が高かった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato H, Arawaka S, Wada M, Kawanami T, Tanaka F, Sobue G, Emi M, Kato T: Segmental copy number loss of the PCSK6 gene in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Trends Neurol*, in press.
- 2) Arawaka S, Fukushima S, Sato H, Sasaki A, Koga K, Koyama S, Kato T: Zonisamide attenuates α -synuclein neurotoxicity by an aggregation-independent mechanism in a rat model of familial parkinson's disease. *PLoS One*, 9(2), e89076, 2014
- 3) Sato H, Kato T, Arawaka S: Potential of cellular and animal models based on a prion-like propagation of α -synuclein for assessing antiparkinson agents. *Mol Neurobiol*, 2014; Aug 21. (Epub ahead of print)
- 4) Iseki C, Takahashi Y, Wada M, Kawanami T, Adachi M, Kato T: Incidence of idiopathic normal pressure hydrocephalus (iNPH): a 10-year follow-up study of a rural community in Japan. *J Neurol Sci*, 339(1-2), 108-112, 2014.

2. 学会発表

- 1) 佐藤裕康、佐々木飛翔、荒若繁樹、加藤丈夫 : AAV- α -synuclein 発現ラットパーキンソン病

モデルでの α -synuclein 凝集体伝播の検討。
第 55 回日本神経学会（総会）、福岡、2014
年 5 月 21 日・24 日

- 2) 佐々木飛翔、荒若繁樹、加藤丈夫：ウエスタ
ンブロッティングにおける α -シヌクレインの
高感度検出法の検討。第 55 回日本神経学会
（総会）、福岡、2014 年 5 月 21 日・24 日
- 3) 小山信吾、佐藤秀則、和田 学、荒若繁樹、
川並 透、加藤丈夫：パーキンソン症状を契
機に診断され新規 SLC20A2 遺伝変異を認め
た家族性 IBGC の 1 家系。第 55 回日本神経
学会（総会）、福岡、2014 年 5 月 21 日・24
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

分担研究報告書

オプチニューリンノックアウトマウスの作製と評価

研究分担者：川上秀史¹⁾

研究協力者：倉持真人¹⁾，大澤亮介¹⁾，平木啓子¹⁾，森野豊之¹⁾，丸山 博文²⁾

1) 広島大学原爆放射線医科学研究所分子疫学研究分野

2) 広島大学大学院医歯薬保健学研究院脳神経内科学

研究要旨

我々が ALS の原因遺伝子として同定したオプチニューリン（OPTN）に関して、ALS 発症に関する機序はわかっていない。OPTN の ALS 発症における作用機序を解明するために OPTN ノックアウトマウスを作製した。評価方法として体重、行動学的解析、及び組織学的検討を行った。いずれも 24 ヶ月の時点で有意な変化なく、マウスモデルの発症には他の要因が必要であることが示唆された。

A. 研究目的

我々が ALS の原因遺伝子として同定したオプチニューリン（OPTN）は、多様な分子機構に関与している。近年、OPTN が関わる ALS 発症のメカニズムとしてオートファジーやネクロプトーシスなどが挙げられているが、いまだ明確なことはわかっていない。そこで、本遺伝子欠損による疾患モデルを作製し、OPTN の ALS 発症における作用機序を解明し、新規治療法開発のためモデル動物を作製することを目的とする。

B. 研究方法

劣性遺伝形式のモデルとしてターゲティングベクターを用いた OPTN ノックアウトマウスを作製した。評価方法として身体的指標に体重の測定、行動学的解析にはロータロッド試験を行った。さらに免疫染色法を用いて組織学的検討を行った。（倫理面への配慮）

広島大学動物実験委員会へ動物実験計画書を提出し、広島大学長の承認のもと動物実験を行った。

C. 研究結果

OPTN ノックアウトマウスを 24 か月齢まで飼育・観察したが雌雄共に特に顕著な変化は見られなかった。体重およびロータロッド試験を経時的に行ったが、明らかな変化は認められなかった。

さらに脊髄の ChAT 陽性細胞数（運動ニューロン数）を定量解析したが、有意な差は見られなかった。また、ノックアウトマウスの中に高齢時のロータロッド試験で運動機能の低下を示す個体が複数いたので、これらについてピックアップして再度解析を行ったが、運動ニューロン数の減少は見られなかった。

D. 考察

OPTN ノックアウトマウスにおいて、ALS 類似の表現系が現れなかったことは、マウスでは、発症のため他の要因が必要であることを示唆している。今後は、様々なストレスを与えることにより、発症するか検討したい。

E. 結論

現時点では、OPTN ノックアウトマウスにおいて明確な ALS 様症状を確認することはできなかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mochizuki Y, Kawata A, Maruyama H, Homma T, Watabe K, Kawakami H, Komori T,

Mizutani T, Matsubara S. A Japanese patient with familial ALS and a p.K510M mutation in the gene for FUS (FUS) resulting in the totally locked-in state. *Neuropathology*

34/5 504-9 2014

2. Mochizuki Y, Kawata A, Hashimoto T, Akiyama H, Kawakami H, Komori T, Oyanagi K, Mizutani T, Matsubara S. An autopsy case of familial amyotrophic lateral sclerosis with FUS R521G mutation. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener* 15・3-4, 305-8, 2014

3. Ayaki T, Ito H, Fukushima H, Inoue T, Kondo T, Ikemoto A, Asano T, Shodai A, Fujita T, Fukui S, Morino H, Nakano S, Kusaka H, Yamashita H, Ihara M, Matsumoto R, Kawamata J, Urushitani M, Kawakami H, Takahashi R. Immunoreactivity of valosin-containing protein in sporadic amyotrophic lateral sclerosis and in a case of its novel mutant. *Acta Neuropathol Commun.* 10;2(1):172. 2014

2. 学会発表

1. 森野豊之, 平木啓子, 倉重毅志, 和泉唯信, 山崎 雄, 高橋哲也, 丸山博文, 伊東秀文, 川上秀史: *MAPT*の新規挿入変異を認めたFTDP17の2家系. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014/5/21

2. 秋月真由美, 山下博史, 植村健吾, 丸山博文, 川上秀史, 伊東秀文, 高橋良輔: *NF-κB*経路を介したOptineurinのノックダウンによる神経細胞死. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014/5/21

3. 金井雅裕, 宮本亮介, 村田佳子, 向井洋平, 山本敏之, 和泉唯信, 梶 龍兒, 森野豊之, 川上秀史, 新宅治夫, 坂本 崇, 村田美穂: 本邦初かつ新規変異を有するSepiapterin reductase(SPR)欠損症の1例. 第55回日本神経学会学術大会, 福岡, 2014/5/21

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

孤発性 ALS では circulating small RNA の恒常性が低下する

研究分担者：佐々木秀直

研究協力者：高橋育子，矢部一郎

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

研究要旨

ALS 患者血漿中の RNA について、その濃度及び RNA サイズ別の濃度勾配を検討した。ALS 患者血漿から抽出した RNA では健常対照群と比較し、より分散が大きく、かつ miRNA を含む小さな画分の割合が高くなった。上記の傾向は症状の進行が早い群でより顕著であった。これまで主に細胞及び動物実験、病理像から検証されていた ALS における RNA splicing の異常について、生存中の患者検体から支持的な所見を得た。

A. 研究目的

non coding RNA の機能には、酵素活性及び誘導機能、構造体を形成、クロマチン修飾などあるが、ALS に関してはこれまで、miRNA 及び核内 lnc RNA に着目した研究が主体である。miRNA を含む small RNA の一部は循環環境中へ分泌され、かつ分解されずに検出できるため容易に患者からも採取可能であるが、2015 年 1 月現在は少数の実験系において主に microarray 及び PCR array plate を用いた研究のみが報告されている。

我々は孤発性 ALS (sALS)患者 16 例及び健常コントロール 10 例を対象とし、血漿を対象に microarray を用いた網羅的な miRNA 解析を施行し、増加、減少した miRNA を ALS のバイオマーカー候補とした。バイオマーカー候補を検証するため、より多数のサンプルを集積し、また異なる実験系である qRT-PCR 法を選択した。各々の miRNA について定量値を求めるにあたり、サンプルより抽出した RNA について、その濃度及び RNA サイズ別の濃度勾配を検討した。

B. 研究方法

患者及び正常対象；年齢及び性別をマッチさせた sALS 患者 50 名及び健常成人コントロール 50 名を対象とした。sALS 患者群については El Escorial, Airley House diagnostic criteria において possible 以上の患者を選択。採血時に複数の臨床

指標を共通して記録した。（発症日，採血日，初発症状，ALSFRS-R, bulbar score, Birthel Index, 死亡ないしは永続的な人工呼吸器の使用開始日）
RNA 抽出；保存凍結血漿 200µl に対し、cel-miR-39-3p 400 amol を添加した後、miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN, Limberg, Netherlands) を用い total RNA を抽出した。なおフィルターの破損などにより抽出の質が信頼できないサンプル 5 件分(ALS 2 件, control 3 件)を除外した。抽出時の elution solution は全て 25µl に統一した。

Total 及び Small RNA の測定；Bianalyzer 2100, Agilent RNA 6000 pico kit, Agilent Small RNA kit（いずれも Agilent Technology, Santa Clara, CA）を用い測定を行った。

（倫理面への配慮）

研究へ参加した患者及び健常対照者については口頭及び文書にてインフォームドコンセントを取得した。また、この研究を遂行するにあたり北海道大学病院及び関連各施設の倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

患者及び対象者の特性は表 1 の通りであった。

ALS 患者血漿から抽出される total RNA は健常対照群からのものと比べより大きな分散を示した（図 1）。small RNA でも同様の傾向が認められ

た。更に、進行の早い ALS ではそうでないものよりも患者血漿中 total RNA は増加し、またその分散は大きかった (図 2)。上記の分散の大きさは 40-80 nt の画分のばらつきによる影響が大きい(もともと全体に占める量が多い部分である)。ALS では small RNA の中でも塩基数が少なく miRNA も含む 10-40nt の割合が正常よりも増加した (図 3,4)。

D. 考察

家族性 ALS の原因遺伝子として発見された TARDBP, FUS, SMN 等の遺伝子は RNA 結合蛋白質である heterogeneous ribonucleoproteins (hnRNPs) の遺伝子である。sALS において脊髄前角から抽出した mRNA pool の網羅的な測定における exon splicing の亢進及び splicing 異常の増加が報告されている⁽⁴⁾。TDP-43 Q331K 変異を導入した実験動物では実際に運動ニューロン病に類似した症状と病理像を呈し、かつ CNS に置ける大規模な pre-mRNAs に対する splicing の変化をもたらした⁽⁵⁾。miRNA は splicing によって得られる small ncRNA であると同時に、splicing を制御する因子ともなることが知られている。我々は ALS 患者血漿中において small RNA の電気泳動パターンに正常コントロール群と比較して明らかな変化を認めた。これらは間接的ではあるが、ALS における splicing 異常との関わりを示唆する。

E. 結論

ALS 患者血漿から抽出した RNA では健常対照群と比較し、より分散が大きく、かつ miRNA を含む小さな画分の割合が高くなった。上記の傾向は症状の進行が早い群ではより顕著であった。これまで主に細胞及び動物実験、病理像から検証されていた ALS における RNA splicing の異常について、生存中の患者検体から認めることができ、支持的な事象である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wakabayashi K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Utsumi J, Sasaki H. Analysis of microRNA from archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol Commun* 2:173, 2014

2. 学会発表

高橋育子, 矢部一郎, 内海 潤, 佐々木 秀直. Identification of plasma miRNA as ALS biomaker, 第 56 回日本神経学会学術大会, 新潟, 2015 年 5 月 20 日~23 日

H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得

発明の名称: 筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカー.

出願番号: 特願2014-006096

出願日: 平成 26 年 1 月 16 日

2. 実用新案登録

該当なし

Clinical Diagnosis	No. of Subjects	Age Mean	Age Range	Male	Female
ALS	48	66.67±10.52	43-84	28	19
Control	47	67.09±10.89	42-84	29	18
Total	95				
				Mean	SD
Disease duration from onset to collection samples				20.04	18.43
Initial symptoms (b;bulbar, u;upper extremities, l;lower extremities)				b; 20	u; 17
ALSFRS-R				33.25	11.72
Bulbar symptoms' score of ALSFRS-R				8.063	4.04
Barthel Index				68.02	34.24
Disease duration from onset to end point				29.82	19.48

表 1. 臨床上的特性

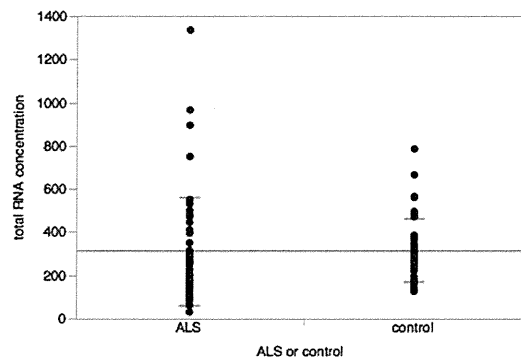


図 1. 総 RNA 濃度

両側 F 検定: F 値 2.87, p 値 0.0005*, Bartlett: F 値 12.20, p 値 0.0005*

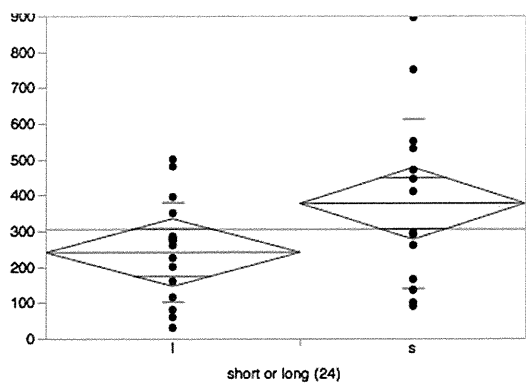


図 2. 総 RNA 濃度

s: 全経過時間が 24 ヶ月未満. l: 全経過時間が 24 ヶ月以上. Student's t test において $Prob>|t|=0.0523$, 両側 F 検定 F 値 2.88, p 値 0.0453*, Bartlett F 値 3.96, p 値 0.0466*

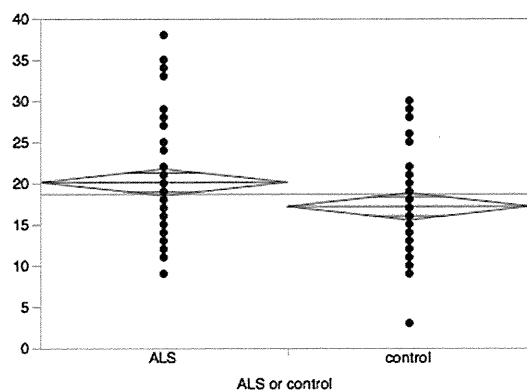


図 3. サイズ $10 \leq nt < 20$ の RNA(%)

Student's t test において $Prob>|t|=0.0130^*$

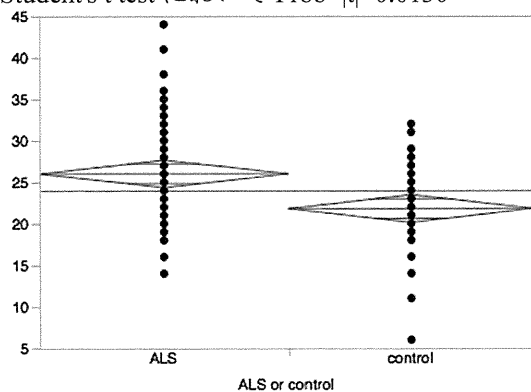


図 4. サイズ $20 \leq nt < 40$ の RNA(%)

Student's t test において $Prob>|t|=0.0006^*$