

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K18226

研究課題名(和文) GUS-D6を用いた新たなCSPG分解療法の確立とそのALSへの応用

研究課題名(英文) Establishment of a new CSPG degradation therapy using GUS-D6 and its application to ALS

研究代表者

及川 弘崇(Oikawa, Hirotaka)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：00732041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではALSの病変部に蓄積するコンドロイチン硫酸プロテオグリカンを分解する酵素 β -グルクロニダーゼ(GUS)を用いた新たな治療法を開拓することを目的に行った。しかしながら、中枢神経移行性が高いGUS-D6の自家精製に失敗したためGUSで実験を行った。Neuro-2a細胞に、GUSを適用したところ、軸索伸長傾向を観察した。また、自然型マウス尾静脈からGUSを投与したところ、中枢神経系と脊髄への移行性を観察した。よって、GUS-D6でなくても治療効果が期待できたため、ALSモデルマウスにGUS投与を行った。その結果、ALS症状の発現を3週間ほど遅延させ、脳萎縮の減退の可能性が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSの病態発症の原因としては異常タンパク質凝集やそれに付随する神経突起の短縮、ミトコンドリア機能障害や酸化ストレス、神経の炎症や興奮毒性による神経細胞死など多岐にわたる。本研究は、これまでにアプローチが全くといってなかった運動神経の外部環境を調整する方法でALSの病態改善を目指したところに新規的な意義がある。結果的に、ALSモデルマウスにおいて、病態発症の遅延の可能性までしか確認できず、劇的な治療効果は得られなかった。しかしながら、現在の臨床治療薬リルゾールや、近年ALSに有効性があると報告があったロピニロールと、GUSを併用する事によってALS患者のQOL改善効果が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a new therapeutic approach using β -glucuronidase (GUS), an enzyme that degrades chondroitin sulfate proteoglycans that accumulate in ALS lesions. However, experiments were performed with GUS because autologous purification of GUS-D6, which has high CNS migration, failed. When GUS was applied to Neuro-2a cells, a tendency toward axonal outgrowth was observed. In addition, when GUS was administered through the tail vein of wild-type mice, translation to the central nervous system and spinal cord was observed. Therefore, since a therapeutic effect could be expected even without GUS-D6, GUS administration was performed on ALS model mice.

As a result, a delay of about 3 weeks in the onset of ALS symptoms and a possible reduction in brain atrophy was observed.

研究分野：薬理学、組換えタンパク質製剤

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ALS β -グルクロニダーゼ GUS

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋萎縮性側索硬化症(ALS)とは脳や脊髄にある運動神経の急速な障害により、筋萎縮に伴う筋力低下を起こす神経変性疾患である。その予後は不良であり、早い場合は発病後20ヶ月ほどで呼吸麻痺が進行し死に至る。その病因は未だ明確に絞られておらず、異常タンパク質の凝集や酸化ストレスの亢進、興奮毒性や神経炎症などで惹起される神経細胞死、または本研究対象であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の蓄積による神経突起の伸長不全などがある。このように、病因が多岐にわたるためALS患者の9割は原因不明の孤発性ALS(sALS)である。一方で、SOD1遺伝子異常のような遺伝的に継代される家族性ALS(fALS)は1割程度である。sALSおよびfALSの病態としての共通性はあるものの、病因における共通性の知見はごく僅かであった。その共通性のある知見の中に、sALS及びfALS患者の剖検脊髄においてアストロサイト(Ast)の増殖があるというものがある。そして、fALSモデルラットであるSOD1変異ラットにおいて、運動神経の主病変部位にAstの増加とCSPGの進行性の沈着が起こる事が報告された(Mizuno H, et al. J Neurosci Res. 2008)。神経障害時におけるCSPGの沈着は、神経突起伸長を阻害し、神経回路網の再構築を妨げる事が知られている。またヒトの筋力は、運動単位の20%が維持できれば代償機能により患部筋肉の収縮力を保つ事が可能とされている。よって、ALSの主病変部位に沈着しているCSPGの制御を行えば、神経突起の伸長を促し神経回路網の再構築が指向できる。そのサポートをすれば、sALSやfALSにかかわらずALSの病態を改善できると考える。そこで、CSPGを標的とした薬剤によるALS性神経障害の治療方法の確立に着目した。

(2) 筆者は、希少疾病であるムコ多糖症 VII 型(MPS VII)の酵素製剤の開発研究を行っていた。MPS VII は、リソソーム内の CSPG 分解酵素である β -グルクロニダーゼ(GUS)の欠損や異常によりリソソーム内に CSPG が蓄積することにより、骨形成不全をきたす病気である。その治療薬として、骨移行性を向上させた酵素製剤の開発を行った。これは、GUS にアスパラギン酸鎖を付加し(GUS-D6)マイナスチャージすることによって、骨基質の Ca^{2+} に選択的に移行させるという酵素製剤である。興味深い事に静脈投与を行うと、GUS-D6 は GUS よりも約 3 倍脳へ移行する事が明らかとなった。さらに、MPS VII モデルマウスに酵素補充療法を行ったところ、大脳皮質と海馬における CSPG 蓄積減少を観察した (Oikawa H, et al. Mol Genet Metab. 2008)。以上の事から、中枢移行性を有する CSPG 分解酵素の投与を ALS に応用する着想に至った。

(3) 研究開始当時の ALS の薬物治療法は、グルタミン酸放出抑制剤のリルゾールと脳保護剤のエダラボンを使用した運動神経に直接アプローチをする治療法であった。また海外では、標的遺伝子のアンチセンス治療、遺伝子治療、幹細胞移植。そして日本では、肝細胞増殖因子(HGF)の髄腔内投与の治療が行われていた。しかしながら、その治療のすべてが運動神経を直接標的とした治療方法であり、運動神経の外部環境を整えることによって、神経突起伸長を補助するアプローチの治療法がない状態であった。中枢移行性を有する CSPG 分解酵素を ALS に適用し ALS の主病変部位に沈着している CSPG を分解し、運動神経の外部環境制御による神経回路の再構築を指向する本研究課題は新規制がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、中枢移行性の CSPG 分解酵素を用いた、運動神経機能回復のための酵素療法の確立を指向する。そして、運動神経機能障害からのより高い回復率を実現して、ALS 患者の QOL 向上に貢献したい。そこで以下の3点の目的を設定した。

酵素製剤の CSPG 阻害作用とそれによる神経突起伸長作用を、マウス脊髄由来神経芽細胞腫である Neuro-2a を用いて明らかにする (*In Vitro*)。

Wild-type マウスにおける酵素製剤の中枢神経系への移行性について酵素活性を指標に明らかにする (*In Vivo*)。

ALSモデルマウスに対して酵素療法を行い、神経突起伸長による神経回路網回復能、ALS病態進行遅延能、及び延命効果を明らかにする(前臨床試験)。

3. 研究の方法

(1) 2 カラムアフィニティークロマトグラフィーにより酵素精製。

GUS-D6の酵素製剤は市販されていないため自主精製を行う。チャイニーズハムスター卵巣細胞株(CHO-K1)にヒトGUS-D6を遺伝子導入したものを培養する。そしてその培養上清を酵素精製に用いる(Oikawa H, et al. Mol Genet Metab. 2008)。

(2) 酵素製剤適用による神経突起伸長促進作用の検討。

マウス脊髄由来神経芽細胞腫であるNeuro-2aを用いて、コンドロイチン硫酸(CS)適用下と非適用下の条件を設定し、それと同時に酵素製剤の適用と非適用に分類して培養実験を行った。細胞播種前日よりポリ-L-リジンでプレートコーティングをおこない、Neuro-2a細胞を 1.0×10^5 cells/mlで撒き、20 μ g/ml濃度のCSを含むDMEMで1日間培養した。その後、20 μ g/ml濃度のCSの適用または非適用の条件下で、5,000 u/g濃度のGUSの適用を行い、4日間培養を行った。この期間通じて無血清培地で行った。その後、神経細胞特異的マーカーであるMAP-2を用いて免疫染色を行い、10 mm²四方のMAP-2陽性細胞のカウントと神経突起の伸長の様子を観察した。

(3) GUSの酵素組織移行性の検討。

C57B/6マウスの自然型を用いて尾静脈より250 U/mLのGUS投与を行い、投与20分後に麻酔下で屠殺解体し大脳皮質と脊髄を摘出した。 -Glucuronidase Activity Assay Kitを用いて摘出した臓器のGUS酵素活性を測定し、静脈投与したGUSの組織移行性について検討した。

(4) ALSモデルマウスに対する酵素療法。

本実験系ではジャクソンLabよB6SJL-Tg(SOD1*G93A)のALSモデルマウスを購入し使用した。本実験系で使用したB6SJL-Tg(SOD1*G93A)マウスではヘミ接合体(ALS Hem)の個体で病態を発症し、出生後3ヶ月齢でALS様病態を発病する。最初は後肢の運動麻痺から始まり、1ヶ月の間で死に至る。そこで、ALS様症状を発症する前の2ヶ月と3週齢のALS Hemを用いて、Wild-typeマウス群、未治療ALS Hemマウス群、酵素投与ALS Hemマウス群の3群を準備した。Wild-typeマウス群と未治療ALS Hemマウス群には生理食塩水を、酵素投与ALS Hemマウス群では4,000 U/gのGUSを5 μ L含有した薬剤100 μ Lを3日ごとに尾静脈から投与する条件下で行った。

(5) 酵素療法によるALS病態進行遅延効果の検討。

酵素療法開始から1週間ごとにロータロッド試験を行い運動機能の協調性と平衡感覚または握力と運動能力の検討を行った。マウス用ローターロッドは室町機械株式会社のMK-610Kを使用し、等速回転プログラムで10 rpmに回転速度を設定し、1分間の測定を行った。

(6) ALSモデルマウスに対する酵素療法の脳への影響検討

未治療ALS Hemマウス群は試験開始約1ヶ月後にその病態により死亡するので、4ヶ月齢になる前の週で未治療ALS Hemマウスの様子を見て屠殺解体した。また、酵素投与ALS Hemマウスに関しても様子を見て屠殺解体し、その週齢に即したWild-typeマウスを屠殺解体した。これらの検体から脳を採取し脳の重量を測定し、嗅球末端から小脳末端までの長さを計測した。続いて摘出した脳を4%パラホルムアルデヒドで固定したあと、10%から30%までのスクロースで段階的に置換を行い、その後10 μmの凍結切片を作成し、MAP-2、GUS、GFAPの特異的抗体を用いて免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) 酵素精製のために CHO-K1 にヒト GUS-D6 を遺伝子導入したものを作成する際に、遺伝子導入時に CHO-K1 細胞の大量細胞死が起きてしまった。いくつか、酵素分泌をする細胞があったため、クローニングを試みたが細胞増殖に至らず酵素精製に関しては頓挫した。現在、導入遺伝子に関してはプラスミドベクターで保存している。一方で、native 型の GUS 酵素は市販で購入可能なため、以後の実験は Native 型の GUS を使用した。

(2) 本研究の培養系ではCS及びGUS適用をする際に無血清培地を用いている。培養Neuro-2a細胞は無血清培地で培養すると突起伸長をすることは知られている(図1a矢印)。培養Neuro-2a細胞を用いた酵素製剤適用による神経突起伸長促進作用についてMAP-2陽性細胞を指標に検討したところ、無血清培地で若干の突起伸長を示していたが、CSを適用するとその突起伸長が抑制されることが観察された(図1b)。また、5,000 U/g濃度のGUSを適用したところ突起伸長を促進する傾向があることが観察された(図1c,1d)。一方で、CS存在下であったとしても、GUS適用をしていると有意な突起伸長の抑制効果は観察されなかった。また、MAP-2陽性細胞の細胞体をカウントしたところ、CS-,GUS-が 441.3 ± 33.4 cells/10mm²、CS-,GUS+が 585.3 ± 89.8 cells/10mm²、CS+,GUS-が 289.3 ± 17.8 cells/10mm²、CS+,GUS+が 586 ± 95 cells/10mm²であった。よってCS適用により減少傾向にある細胞体数がGUS適用によって抑制されていることが観察された。

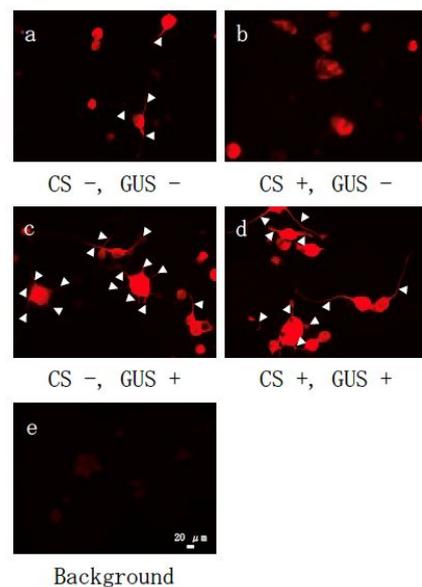


図1 GUS適用によるNeuro2aの突起伸長効果

(3) C57B/6マウスに250 U/mL濃度のGUSを尾静脈から投与し、投与20分後の大脳皮質と脊髄のGUS酵素活性の検討を行った。その結果、大脳皮質では426.9 μU/mLであり、脊髄では515.13 μU/mLであった。平時のGUS酵素活性は大脳皮質で213.1 μU/mL、脊髄で242.4 μU/mLである

ため、250 U/mL濃度の静脈投与であったとしても少なくとも20分後には中枢神経と脊髄に平時の2倍程度のGUSを送達することが可能であることが明らかとなった。以上の結果より、当初予定だった中枢移行性が高いIGUS-D6でなくても治療効果が得られる可能性が示唆された。

(4) 次に ALS Hem マウスへの GUS 投与を行なった。ALS Hem マウスは3ヶ月齢を過ぎたあたりから後肢に運動障害が発症し、1週間以内に劇的に後肢が動かなくなる。ローターロッドの等速回転試験を10 rpmの条件で行ったところ、3ヶ月齢ではWild-typeとALS Hemいずれも1分間回転運動を行えたが、ALS Hemでは3ヶ月と1週齢ですでにローターロッド試験に耐えられずに5秒以内にはローターロッドより離脱した。しかしながら、ALS HemにGUSを投与すると4ヶ月齢までは1分間の試験に耐えることができていたが、4ヶ月と1週齢にはローターロッド試験から5秒以内に離脱した。また、図2は屠殺解体する1週間前の図であるが、GUS投与がないと前肢によるグルーミングもままならないため、目脂で目が荒れて視界不良な状況が観察された(図2矢印)。よって、運動障害が発症してからの進行は早いですが、GUSはその運動障害の発症を遅らせる可能性が示唆された。



図2 酵素製剤効果運動能遅延効果

(5) 一方で、屠殺解体後に脳の重さを軽量したところ、Wild-typeでは28.7 mg、GUS投与したALS Hemでは18.1 mg、そして、ALS Hemでは14.2 mgであった。嗅球末端から小脳末端までの長さはWild-typeでは1.6 cm、GUS投与したALS Hemでは1.4 cm、そして、ALS Hemでは1.3 cmであった。次に摘出した脳組織から凍結切片を作成し、MAP-2 特異的抗体、GUS 特異的抗体、GFAP 特異的抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、GUS陽性細胞はALS HemとGUS投与したALS hem両条件において検出はできなかった。また、GFP陽性細胞はwild-type、ALS Hem、GUS投与したALS Hemのいずれの条件においても形態的な変化は観察されなかった。一方MAP-2 特異的抗体を用いた免疫染色では、Wild-typeの脳皮質の形態と比較してGUS投与したALS Hemの脳皮質形態には変化が観察されず神経突起の形態が維持されていたのに対して(図3a, 3b)、GUS未処置群のALS Hem脳皮質では神経突起が途切れ短くなっている傾向があることが観察された(図3c)。このことより、GUS投与により、若干の脳萎縮遅延効果の可能性は推察できるが、中枢神経における神経細胞死の抑制効果は期待できないと考えられる。

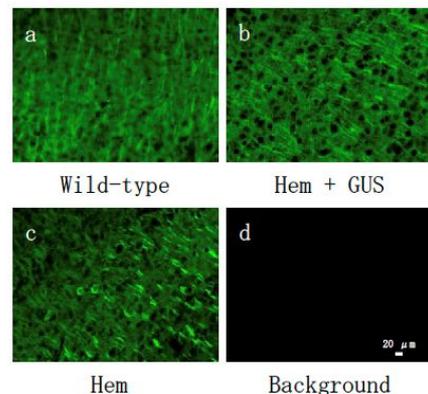


図3 酵素製剤投与による神経突起保護効果

以上の結果より、ALS Hemにおいて、GUSによる酵素治療は病態発症の遅延の可能性までは推察できるが、劇的な延命と病態改善の治療効果は得られなかった。しかしながら、神経突起伸長を補助する可能性はあるため、現在使用されているリルゾールによるグルタミン酸の興奮毒性抑制とエダラポンの抗酸化作用との併用により、神経細胞死を抑制しつつ突起伸長を行えばALS患者のQOL改善効果は期待できるのではないかと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyazaki Shouhei, Oikawa Hirotaka, Takekoshi Hideo, Hoshizaki Masako, Ogata Masato, Fujikawa Takahiko	4. 巻 24
2. 論文標題 Anxiolytic Effects of Acanthopanax senticosus HARMS Occur via Regulation of Autonomic Function and Activate Hippocampal BDNF/TrkB Signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 132 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24010132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oikawa Hirotaka, Fujikawa Takahiko, Tomatsu Shunji	4. 巻 2
2. 論文標題 Current therapy of spinal cord injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 Issue6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 イ)Shouhei Miyazaki, Hirotaka Oikawa, Shoko Nakamichi, Tetsuya Hirata, Hiroo Yamasaki, Yasuyo Yamaguchi, Wenping Zhang, Sansei Nishibe, Masato Ogata, Takahiko Fujikawa	4. 巻 3
2. 論文標題 5.Aroma of Eucommia leaf extract (ELE) causes reduced locomotor activity and increased NREM sleep, acting like the partially related factors of oral ELE 's effects with locomotor-activity-dependent-increase in NREM- and REM-sleep.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Global Drugs and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 Issue2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/GDT.1000S2001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hirotaka Oikawa, shyouhei Miyazaki, Takahiko Fujikawa
2. 発表標題 Challenge to Elucidate the Cause of Depression-like Symptoms by Individuality.
3. 学会等名 International Conference on Neurovascular and Neurodegenerative diseases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroataka Oikawa, Shouhei Miyazaki, Rina Kato, Masato Ogata, Takahiko Fujikawa
2. 発表標題 Correlation between rat personality and learning ability, and possible involvement of NR1 subunit.
3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及川弘崇 藤川隆彦 戸松俊治
2. 発表標題 同腹仔の低アルカリフォスファターゼ症モデルマウスの重症度の違いについての報告
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 及川弘崇、古川絢子、宮崎翔平、藤川隆彦
2. 発表標題 臨界期マウス一次視覚野で変動するタンパク質のプロテオーム解析
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------