

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：23701
 研究種目：挑戦的研究（萌芽）
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K19666
 研究課題名（和文）ヒト乳歯歯髄幹細胞とその有効成分を活用した筋萎縮性側索硬化症の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis using human deciduous dental pulp stem cells and their active ingredients

研究代表者
 保住 功（Hozimi, Isao）
 岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：20242430
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：家族性筋萎縮性側索硬化症患者由来の運動ニューロンは、細胞内凝集体形成や細胞死を起こしやすい。変異SOD1遺伝子を組み込んだA2a細胞を作製し、細胞内凝集体、不溶性異常タンパク質蓄積を確認し、モデル系を確立した。ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清を投与することで、不溶性異常タンパク質の蓄積抑制効果が明らかになった。ブラジル産グリーンプロポリスの抽出成分、その成分ケンフェロール、ニコチン酸受容体 7nAChRアゴニストが細胞死を抑制できることも証明した。SOD1遺伝子変異ALS患者、孤発性ALS、健康者controlのiPS細胞を運動ニューロンへと分化誘導させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症（ALS）はこれまで多くの研究がなされ、モデル細胞やモデル動物を使って多くの創薬が提言されてきたが、ヒトにおいて臨床上満足のいく有効な薬剤は見出されていない。ヒトiPS細胞を使った研究は新たな創薬への道を切り開いている。ALSの病態は複数の要因が多面的に作用しており、単一薬剤での十分な有効性は得がたい。SHED-CMは多くの有効成分を含み、自然が作りだした複合剤で、神経難病への活用に期待が大きい。SHED-CMの有効性についてN2a細胞モデル系を使って証明し、作用機序、有効成分について検索した。ALS患者由来のiPS細胞についても準備し、創薬スクリーニング系を立ち上げた。

研究成果の概要（英文）：Motor neurons derived from patients with familial ALS are prone to aggregate formation and cell death. As A2a cells, a mouse neuroblastoma cells, into which the mutant SOD1 gene was incorporated, have shown intracellular aggregates and insoluble abnormal proteins, an ALS model cell system has been established. Administration of human deciduous dental pulp stem cell culture supernatant (SHED-CM) was found to suppress the accumulation of insoluble abnormal protein. In addition, ethanol extract components of Brazilian green propolis, as well as its selective components of kaempferol and also 7nAChR, a nicotinic acid receptor, have revealed to activate autophagy and suppress cell death. We have prepared differentiation to motor neurons using iPS cells derived from a patient with SOD1 mutation, a patient with sporadic ALS, and a healthy control.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症（ALS） ヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清（SHED-CM） Cu/Zn SOD（SOD1） 凝集体 iPS細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS)は重篤な筋萎縮と筋力低下を引き起こし、進行も速く、多くは約2~5年で呼吸困難で死亡する難病の中で最も過酷な疾患である。家族性のALS (FALS)の原因遺伝子として、*SOD1*、*TDP43*などが発見された。これらの変異遺伝子を導入したALSモデルマウスがこれまで治療薬開発に広く利用されてきた。しかしながら、これらのALSモデルマウスを用いて、100を越える治療薬が提言されたが、ヒトで十分効果のある薬剤は見出されていない。その理由は、種差に加え、導入遺伝子の過剰なコピー数、過剰なタンパク量の発現など、病態を誇張したカスケードの設定、ALSの発症が単一薬剤で抑えられるほど単純な発症機構ではないことなどが考えられる。したがって、よりヒトに近い疾患モデルおよび、複数の治療標的に対する新たな多面的なアプローチが必要と考えられた。

2. 研究の目的

目的は、複合的かつ相乗的な治療効果を発揮できると期待される歯髄幹細胞培養-上清 (DPSC-CM)の中で、特に強力で、有効性の高いヒト脱落乳歯歯髄幹細胞-上清 (SHED-CM)のALSに対する治療効果を検証する。従来のALSモデルマウスに加え、よりヒト病態に近い患者由来のヒトiPS細胞およびALS自然発症モデル犬を用いて評価し、その有効成分を明らかにする。SHED-CMの有効成分の中の、いわば、‘山中4因子’のような複合して有効な因子を探索、解明し、いわば‘カクテル療法’といったALSに対する全く新たな治療法への道を切り開く。

3. 研究の方法

(1) ALS原因遺伝子の蓄積モデルを用いた検討

ALS原因遺伝子として、*SOD1*、*TDP43*、*FUS*、*C9orf72*が報告されている。そのうち、*SOD1*は銅や亜鉛と結合し、活性を示す。一方で、変異*SOD1*はそれら生命金属との結合ができなくなり、凝集体を形成する。そこで、マウス神経芽細胞腫N2a細胞、運動神経様NSC-34細胞にALS原因遺伝子を遺伝子導入し、凝集体を形成するALSモデル細胞を構築する。SHED-CMによる神経保護効果について検討する。他のALS原因遺伝子についてもALSモデル細胞を構築し、SHED-CMの神経保護効果について検討していく。SHED-CMの作用機序について解析していく。並行して、我々がこれまでの検索、文献から選別した有望な薬剤についても薬効解析を行い、比較検討していく。

(2) 疾患特異的iPS細胞から分化誘導した運動神経細胞の構築と解析

本研究では、京都大学iPS細胞研究所で作製された*SOD1*遺伝子に変異を有する家族性ALS患者由来のiPS細胞、孤発性ALS、健康者から作製したiPS細胞に、*Lhx3*、*Ngn2*、*Isl1*という3つの転写因子を加えて運動ニューロンへと分化誘導させる(参考文献①)。家族性ALS患者由来の運動ニューロンは、*SOD1*の蓄積や細胞死が起こりやすいことがすでに報告されている。まず既報の方法を参考にして、iPS細胞から運動ニューロンへの分化誘導法を確立する(参考論文①)。今後、孤発性ALS患者由来のiPS細胞から作製した運動ニューロンの疾患特異的iPS細胞についても分化誘導法を確立させる。さらに、ALS患者由来の疾患特異的iPS細胞を活用することで、ALSにおける病態の再現と合わせてSHEDの神経保護効果について検討する。

(3) SHED-CMの成分分析

SHED-CMにはすでにMCP-1、ED-Siglec-9などの有効成分が報告されている(参考文献②)。網羅的プロテオーム解析によるSHED-CMの有効成分の探索を行う。また高感度ICM-MSを用いて重金属の解析、合わせて線維芽細胞培養上清、DPSC-CMと比較する。

4. 研究成果

(1) ALS原因遺伝子導入細胞の凝集体形成モデルの作製

初年度(2017年度)はSHED-CMを作用させ、凝集体形成および細胞死の抑制を確認した。変異*SOD1* G85Rが蓄積するモデル細胞(A2a細胞)を作製した(図1)。蓄積モデル細胞にSHED-CMを処置し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内の凝集体を観察し、また、Western blot法を用いて不溶性の異常タンパク質蓄積を検討した。統計解析を行った。結果は、変異*SOD1*を導入した群に関しては細胞内凝集体の有意な増加を確認した一方で、SHED-CM

処置群では、細胞内凝集体が無処置群に比べ有意に減少していた。Western blot法では、1% triton Xに溶けなかった不溶性のものをinsoluble分画とし評価した。変異*SOD1*を導入した群に関してはそれらの不溶性の異常タンパク質が増加しているのに対し、SHED-CM処置群では、そ

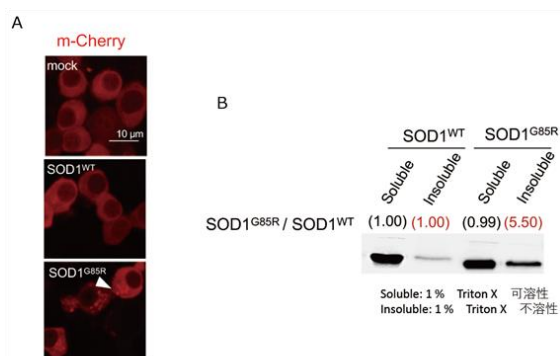


図1. 変異*SOD1*凝集体を示すALSモデル細胞
A 蛍光画像、B 生化学的解析

れらが有意に減少していた。以上より、SHED-CM は変異 SOD1 由来の不溶性異常タンパク質に対し蓄積抑制効果を有することが明らかとなった。

2 年目(2018 年度)には、SHED-CM の作用として、CCK-8 を用いた細胞生存率の検討、LDH 測定による細胞毒性の評価、Bip、Chop の発現による小胞体ストレスへの影響、CellRoxGreen 試薬を用いて酸化ストレスへの影響を検討した。いずれの評価項目においても SHED-CM が 30~70%の範囲内で、至適濃度を持って、その効果が確認できた。

我々は、この確立した培養細胞系を活用して、2017 年に SHED-CM 同様に複数の有効成分を含むブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出成分 (EBGP) さらにその含有成分であるケンフェロール (kaempferol) が細胞内凝集体形成に抑制効果のあることを報告した(発表文献⑤)。一方、抗酸化剤である低分子化合物 1,2-AC20 が・OH、O₂⁻を除去して、神経保護効果を持っていることを報告した(発表文献④)。さらに、ケンフェロールの成分である p-coumaric acid (クマリン酸) にオートファジーを介した凝集体形成の抑制効果があることを見出している(発表論文③)。今後も SHED-CM 同様に、プロポリスのカクテル製剤としての有効性を確認しつつ、その主たる有効成分の検索も進めていく。

3 年度(2019 年度)には、変異 SOD1 G85R 変異以外の変異遺伝子の導入で N2a 細胞内凝集体形成を確認し、ALS モデル細胞を構築している。また、変異 SOD1 G85R を導入した N2a 細胞内凝集体形成モデルを用いて、α7nAChR 選択的アゴニストの凝集体形成の抑制効果について検討を行い、オートファジーを介するその効果を検証した(論文作成中)。

(2) 疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した運動神経細胞の構築と解析

SOD1 遺伝子に変異を有する家族性 ALS 患者由来の iPS 細胞、孤発性 ALS、健康者から作製した iPS 細胞を運動ニューロンへと分化誘導させた。分化させた細胞は運動ニューロンのマーカーでもある SMI-32、HB-9 などの発現が確認できた(図 2) また、孤発性 ALS 患者由来の iPS 細胞から作製した運動ニューロンの疾患特異的 iPS 細胞についても分化誘導法を検討中である。さらに、ALS 患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を活用することで、ALS における病態の再現と合わせて SHED の神経保護効果について検討する。

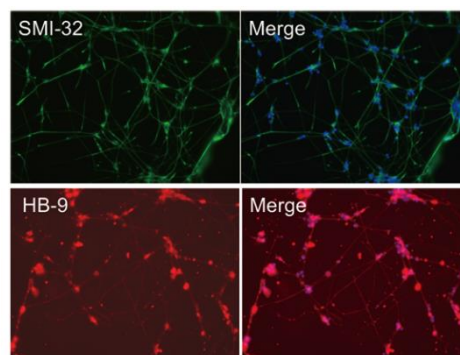


図 2. ALS 患者由来 iPS 細胞から分化誘導した運動ニューロン

(3) SHED-CM の成分分析

SHED-CM は線維芽細胞培養上清、歯髄幹細胞培養上清成分と比較しても、より多くの神経栄養成分が含まれている(未発表)。さらに pilot 的に検索した SHED-CM 成分には Zn, Se などのミネラルも多く含まれている。未知なる成分も含めて有効成分の分析を行っている(未発表)。

総括として、SOD1 G85R 変異の導入の N2a 細胞で、SHED-CM の有効性が確認できた。CCK-8 を用いた細胞生存率の検討、LDH 測定による細胞毒性の評価、Bip、Chop の発現による小胞体ストレスへの影響、CellROX@Green 試薬を用いて酸化ストレスへの影響、いずれの評価項目においても SHED-CM が 30~70%の範囲内で、至適濃度を持って、その効果が確認できた。疾患特異的 iPS 細胞から運動神経細胞へ分化に手間取ったこと、新型コロナウイルスの影響で培養系が一時中止せざるを得ないこともあったが、概ね研究基盤ができあがった。また、孤発性 ALS 患者の髄液においても SOD1 変異体が認められることも明らかにした(発表論文②)。このことは本研究によって SOD1 変異を持った細胞に有効性が見出された SHED-CM が、孤発例 ALS 患者においても有効性がある可能性を示唆している。さらに、歯髄幹細胞 (DPSC)、ヒト脱落乳歯歯髄幹細胞上清 (SHED) およびその上清 (CM) の神経変性疾患への活用については今回の研究成果と展望を踏まえて、今後の研究の礎に英文総説(発表論文①)としてまとめた。

<引用文献>

① Imamura K, Yamanaka S, Inoue H. et al. The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci Transl Med.* 2017 May 24;9(391). pii: eaaf3962. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf3962. PubMed PMID: 28539470.

② Matsubara K, Yamamoto A. et al. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J Neurosci.* 2015 Feb 11;35(6):2452-64. doi:10.1523/JNEUROSCI.4088-14.2015. PubMed PMID: 25673840; PubMed Central PMCID:

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ueda Tomoyuki, Inden Masatoshi, Ito Taisei, Kurita Hisaka, Hozumi Isao	4. 巻 14
2. 論文標題 Characteristics and Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cells on Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00407	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 -
1. 著者名 Tokuda Eiichi, Takei Yo-ichi, Ohara Shinji, Fujiwara Noriko, Hozumi Isao, Furukawa Yoshiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Wild-type Cu/Zn-superoxide dismutase is misfolded in cerebrospinal fluid of sporadic amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Neurodegeneration	6. 最初と最後の頁 42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13024-019-0341-5	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 -
1. 著者名 Ueda Tomoyuki, Ito Taisei, Kurita Hisaka, Inden Masatoshi, Hozumi Isao	4. 巻 20
2. 論文標題 p-Coumaric Acid Has Protective Effects against Mutant Copper?Zinc Superoxide Dismutase 1 via the Activation of Autophagy in N2a Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2942 ~ 2942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20122942	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 -
1. 著者名 Ueda Tomoyuki, Inden Masatoshi, Asaka Yuta, Masaki Yuji, Kurita Hisaka, Tanaka Wakako, Yamaguchi Eiji, Itoh Akichika, Hozumi Isao	4. 巻 92
2. 論文標題 Effects of gem-dihydroperoxides against mutant copper?zinc superoxide dismutase-mediated neurotoxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 177 ~ 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcn.2018.09.001	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 -

1. 著者名 Ueda Tomoyuki, Inden Masatoshi, Shirai Katsuhiko, Sekine Shin-ichiro, Masaki Yuji, Kurita Hisaka, Ichihara Kenji, Inuzuka Takashi, Hozumi Isao	4. 巻 7
2. 論文標題 The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-03115-y	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 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 2件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 T. Ueda, I. Hozumi et al.
2. 発表標題 第40回日本神経科学大会
3. 学会等名 ケルセチンのオートファジーを介した変異copper-zinc superoxide dismutase 1細胞内凝集体に対する神経保護効果
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ueda T, Inden M, Kurita H, Hozumi I et al.
2. 発表標題 The effects of kaempferol against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity via autophagy
3. 学会等名 第18回国際薬理学・臨床薬理学会(WCP2018)(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inden M, Kurita H, Hozumi I et al.
2. 発表標題 The effects of the ethanol extract of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity
3. 学会等名 Neuroscience 2018(国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤泰生、栗田尚佳、位田雅俊、保住 功他
2. 発表標題 変異Cu/Zn superoxide dismutase 1の毒性に対する桂皮酸誘導体の神経保護効
3. 学会等名 第9回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hozumi I
2. 発表標題 The role of metals in ALS and neurodegenerative diseases
3. 学会等名 Keio International Symposium "Metals in ALS" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤泰生、位田雅俊、栗田尚佳、保住 功他
2. 発表標題 変異Cu/Zn superoxide dismutase1毒性に対するプロポリス含有成分の神経保護効果
3. 学会等名 第1回日本脳サプリメント学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田 智之、伊藤 泰生、栗田 尚佳、位田 雅俊、保住 功
2. 発表標題 p-coumaric acidのオートファジーを介した変異SOD1毒性に対する神経保護効果
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 保住 功
2. 発表標題 神経変性疾患におけるメタロチオネイン、生命金属の役割に関する研究
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田尚佳、位田雅俊、保住 功他
2. 発表標題 孤発性筋萎縮症側索硬化症患者における新規microRNAの探索と機能解析
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 位田雅俊、栗田尚佳、保住 功他
2. 発表標題 脳ホメオスタシスとプロテオパチーに關与する神経毒に対する機能性食品成分の效果
3. 学会等名 第10回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	栗田 尚佳 (KURITA Hisaka) (00746315)	岐阜薬科大学・薬学部・講師 (23701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 敏之 (SHIBATA Toshiyuki) (50226172)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	
研究分担者	山本 朗仁 (YAMAMOTO Akihiro) (50244083)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授 (16101)	
研究分担者	神志那 弘明 (KAMISHINA Hiroaki) (50506847)	岐阜大学・応用生物科学部・准教授 (13701)	
研究分担者	位田 雅俊 (INDEN Masatoshi) (70512424)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授 (23701)	
研究協力者	井上 治久 (INOUE Haruhisa)		