

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07498

研究課題名(和文) 標的化遺伝子輸送システムを用いたM2ミクログリア誘導によるALSへの新規治療戦略

研究課題名(英文) A novel therapeutic strategy for ALS with induction of differentiation to M2 microglia by targeted gene delivery

研究代表者

寺島 智也(Terashima, Tomoya)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40378485

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)：筋萎縮性側索硬化症は、確立された治療法がなく、治療法開発が急務である。そこで、我々はその病態進行に深く関わっている炎症惹起型ミクログリア細胞に、我々が同定した標的化ペプチドを用いてピンポイントな遺伝子輸送を行うことにより、神経保護型ミクログリア細胞を誘導することによる、新規治療法の開発を行った。初代培養ミクログリアにて、標的化ペプチドを用いた遺伝子輸送により、炎症惹起型ミクログリアの特異的標識およびmiRNAの標的化輸送に成功し、神経保護型への誘導に成功した。また、ALSモデル動物に対して、ミクログリア標的ペプチド+miRNA複合体の投与を行い、病状の進行抑制および生存曲線の改善を示した。

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は難治性疾患であり、今回の新規治療法開発は、今後の臨床応用を期待させる大変社会的意義の高い研究成果であると言える。また、標的化ペプチドを用いて核酸を輸送することで、内因性の炎症惹起型のミクログリア細胞を神経保護型に誘導する戦略は、外部からの移植を用いる細胞治療やウイルスベクターを用いた遺伝子治療に比べ、免疫反応を最小限に抑えることができ、安全性が高く、他のミクログリア細胞が関与する神経疾患に対する治療への汎用性もあることから、多くの疾患治療研究の礎となる可能性もあり、学術的意義も非常に高いと考える。

研究成果の概要(英文)：There is no established treatment for amyotrophic lateral sclerosis, and the development of its treatment is desired as an urgent issue. Therefore, we tried to establish an inducible method of neuroprotective type microglia from pro-inflammatory type by pinpoint gene delivery using the targeted peptides as a new treatment, because microglia are deeply involved in the progression of the disease. In primary cultured microglia, we succeeded in specific labeling of inflammation-inducing microglia and targeted transport of miRNA by gene transport using targeted MG1, and confirmed the miRNA effect on cell phenotype. In addition, administration of the microglial target peptide + miRNA complex to ALS model animals was shown to suppress the progression of pathological conditions and improve the survival curve.

研究分野：遺伝子治療 再生医療 脳神経内科学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 ミクログリア 標的化輸送 核酸医薬 miRNA ドラッグデリバリーシステム Molecular ZIP code

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、研究者個人に帰属します。

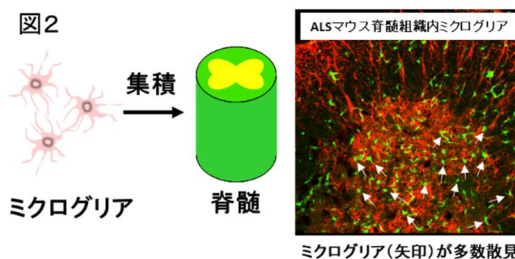
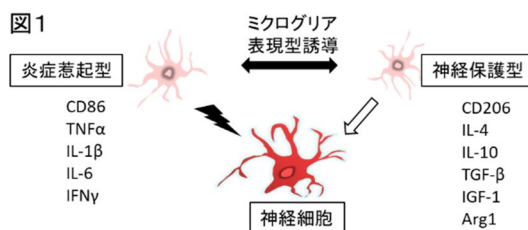
1. 研究開始当初の背景

ALS は、難治性神経変性疾患であり、未だ確立された根本治療はなく、その治療法の開発は急務である。近年、病変部位である脊髄組織内で、神経細胞以外のアストロサイトや炎症細胞、ミクログリア細胞などが、病因に深く関わっていることが報告されており、非細胞自律性神経細胞死 (non-cell autonomous neuronal death) として、ALS のみならず神経変性疾患全般に認められる現象として注目を浴びている。

それら神経細胞を取り巻く細胞のうち、ミクログリアは、その特徴により様々なタイプに分類され、大きく炎症を惹起するタイプ (炎症惹起型: M1) と細胞を保護するタイプ (神経保護型: M2) に分けて考えられている (図1)。

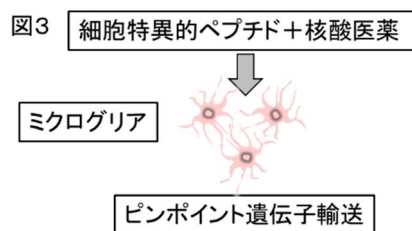
また、ALS 患者および ALS モデルマウスにおいて、M1 および M2 タイプのミクログリアやマクrophage系細胞が、脊髄病変部位に多数集積することが報告されており、それらの細胞が病態に深く関与しており、広く研究されている (図2)。特に病期が進行するとともに、M1 ミクログリアが漸増し、炎症の増強、神経細胞死を誘発し、機能障害を悪化させることは着目すべき点であり、この M1 ミクログリアの神経細胞への影響を抑制することが有効な治療法となると考えられ、ALS の治療標的となると考える。

しかし、脊髄組織内での M1 ミクログリアをターゲットとした薬物療法や遺伝子治療を考えた際に、どのように目的の細胞のみに輸送するかが問題となる。脊髄組織内には、他に、神経細胞をはじめ、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、血管内皮細胞など様々な細胞が存在し、治療標的以外の細胞への影響を考慮する必要がある、その副作用を最小限に抑えるために、標的化が必要である。標的化を実現するツールとして、近年、細胞や組織に特異的なペプチドシグナルの存在があることが提唱され、実際ががん治療へと試みが行われている。このシグナルペプチドは、Molecular ZIP code と呼ばれ、7つのアミノ酸程度で構成される非常に短鎖なペプチドであり、体内の郵便番号の様に考えられており、ピンポイントな分子治療の実現を可能とさせる。



2. 研究の目的

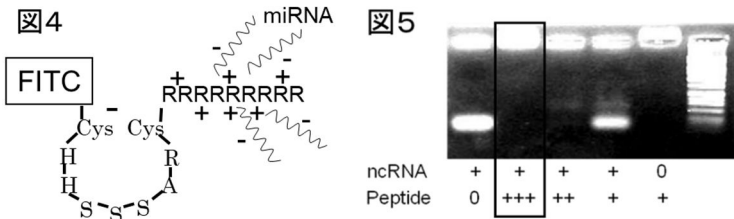
本研究の目的は、非常に短鎖のペプチド (Molecular ZIP code) を用いて、治療標的の細胞のみにピンポイントに small RNA 輸送を行うことで、ALS の新規治療法を開発することである。現在までに多数の miRNA が同定され、また、多くの siRNA (shRNA) が治療実験に用いられているが、安定性の問題や目的の細胞までたどり着かない (RNase への暴露など) ために、効果的な治療が実現できていない。その点、本検討で細胞特異的ペプチドによる治療効果が確認されれば、目的の細胞のみに有効でより安全な治療が可能となり、現在までに臨床応用が期待されている ncRNA (miRNA や siRNA など) の実用化に向けての可能性が格段に向上すると考えられる。また、細胞特異的ペプチドと治療候補 ncRNA の組み合わせは簡便に変更できるため、病態や疾患に応じて、様々な組み合わせを用いることが可能で、“目的の細胞”にのみ“目的の遺伝子”を導入できる画期的なシステムが構築され、神経難病への新たな治療技術となることが期待される (図3)。



また、本研究は、ALS における内因性の M1 ミクログリアを M2 ミクログリアへと高効率に誘導することによる治療を目指していることから、患者自身の脊髄内の細胞を誘導するため、再生医療で行われる細胞移植のための処置や拒絶反応などを考慮する必要はなく、低侵襲で行える治療法である。しかも生体内の病態に対する反応 (ミクログリアの脊髄への増生、集簇) を応用するため、病期の進行とともに M1 ミクログリアが増加すればするほど、誘導により M2 ミクログリアを多数得られるため、相乗的な効果も期待できる。内在性細胞への分化誘導を応用した生理的環境に近い治療法である。また、研究レベルでの成果が得られれば、早期の臨床応用が可能で、非常に画期的な治療となることが期待される。以前よりミクログリアと神経疾患および分子治療の分野にて研究を重ねてきた我々ならではの創造性のある研究であるといえる。

3. 研究の方法

[1] 初代培養ミクログリアによる M1 タイプから M2 タイプへの誘導と神経細胞への影響
 同定済みの M1 ミクログリア特異的結合ペプチド(M1 ペプチド: C-HHSSAR-C) に 9 つのアルギニン(R)連鎖(正電荷に富む)を連結したペプチドおよび、M2 ミクログリアへの誘導が報告されている miRNA を外部業者に合成委託。それら M1 ペプチドと miRNA を静電的相互作用により結合し、標的ペプチドと輸送核酸の複合体を合成する(図4)。ncRNA とペプチドの配合および結合については、電気泳動にて確認済み(次頁図5: 結合した核酸は負電荷を失い、泳動されない)。

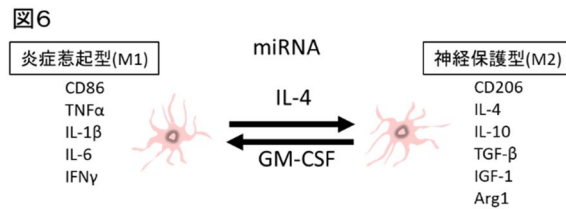


生後 1-2 日のマウス大脳より

単離した混合グリア培養を 14 日間行うことにより、初代培養ミクログリアを得る。得られたミクログリアに上記ペプチド+核酸の複合体を投与し、培養ミクログリアでの取り込み(FITC 蛍光を顕微鏡で確認)を評価し、M2 ミクログリアへの誘導をマーカー遺伝子の発現検索により行う(図6)。IL-4 刺激により M2 ミクログリアが誘導されることは実証済みであるため、陽性コントロールとして用いる。上記複合体投与より、M2 ミクログリアへの誘導を確認するとともに、培養上清を回収し、NSC-34 細胞(運動神経細胞株)に投与し、神経細胞への保護効果を比較する。その際、GM-CSF 刺激にて誘導した M1 ミクログリアの上清を神経細胞死誘発コントロールとして用いる。

[2] 病期別 ALS マウス脊髄ミクログリアへの Molecular ZIP code による標的化

ALS モデルマウス(SOD1tg(G93A))を発症前、早期、中期、晩期の 4 期に分け、FITC ラベルした M1 ペプチドを髄腔内投与する(M1 ペプチドが脊髄内ミクログリアを標識することは、他のマウスで検証済み)。M1 ペプチドを髄注した SOD1-tg の脊髄組織より、標本を作製し、M1(CD86)、M2(CD206)陽性ミクログリアを免疫染色で同定し、M1 ペプチドの標的化

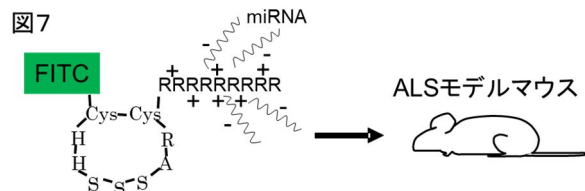


の精度と各病期での M1/M2 ミクログリアの割合を検証する。また、投与量を数種類設定し、標識できる最適の容量を決定する。今までに同定済みのアストロサイト標識ペプチドや後根神経節ニューロン標識ペプチドを陰性コントロールとして用いる。

[3] Molecular ZIP code 標識遺伝子輸送による ALS マウスへの治療検討

[1][2]より得られた基礎検討の結果をもとに、M1 ペプチド+核酸医薬による ALS モデルマウス(SOD1tg(G93A))への治療実験を行う(図7)。

まずは、発症早期からの予防的投与を検討する。投与回数について、週 1 回のみから 2-3 回投与の群に分け、効果判定(行動実験(運動機能検査(Rota-Rod test、grip strength test、Wire-hang testなど)、生存曲線)を行う。エンドステージに至ったマウスを用いて、脊髄組織内の M2 ミクログリアの細胞割合の検証、非治療群との比較検討、残存神経細胞数の検討、遺伝子解析による炎症関連遺伝子の発現抑制の有無など総合的に治療効果を判定する。また、発症前からの予防投与で有効性が示された場合は、治療実験として、運動機能低下などの神経症状が発症した後の発症早期での投与を試み、症状の回復効果が認められるかを検討する。



4. 研究成果

生後 1-2 日のマウス新生児大脳より単離した混合グリア培養を 14 日間行い、初代培養ミクログリアを準備。得られたミクログリアに FITC でラベルしたミクログリア特異的結合ペプチド(M1 ペプチド: C-HHSSAR-C)を投与し、結合実験を施行。コントロールに比し、有意に結合することを確認。次に、M1 ペプチドに 9 つのアルギニン(R)連鎖(正電荷に富む)を連結したペプチドを用意し、合成委託した miRNA との複合体をそれぞれ準備。M1 peptide+ miRNA を初代培養ミクログリアに投与し、遺伝子発現効率について検討した。miRNA のみ、およびリポフェクタミンによる遺伝子導入群と比較して、M1 ペプチド使用により、有意に遺伝子導入効果があることを miRNA の qPCR にて確認した。M1 peptide+ miRNA 投与群において、ミクログリア内で FIZZ、IL-4 遺伝子など M2 マーカー遺伝子の発現上昇を認め、M2 ミクログリアへ誘導されていることが確認できた。また、同時に、miRNA の遺伝子導入により、ミクログリアがどのような遺伝子群

に影響を及ぼすかを調べるために、遺伝子導入後ミクログリアにて mRNA array も施行。ミクログリアの機能に影響すると考えられる遺伝子の候補を、いくつか得ることができた。また、miRNA 遺伝子発現後のミクログリア培養上清を回収し、それらを NSC-34 細胞(運動神経細胞株)に投与することにより、神経細胞への保護効果を検証。酸化ストレス下の条件で、神経細胞保護効果を示すことも確認された。

続いて、ミクログリア初代培養系にて標的化が確認されたミクログリア特異的結合ペプチドを、ALS モデルマウス(SOD1 G93A マウス)に髄腔内投与し、発症前、中期、晩期で組織学的検討を行ったところ、疾患進行に伴い、M1 ミクログリアが多数髄腔内に集積するに伴い、M1 ミクログリア標的ペプチドで標識される細胞が増加していくことが確認できた。次に、培養系で確認した miRNA と標的ペプチドとの複合体を作成し、ALS モデルマウス髄腔内に直接投与し、治療実験を行い、経時的な運動機能評価および生存曲線評価を行った。核酸のみやペプチドのみの群では、全く治療効果を認めないのに比して、標的ペプチド+miRNA 投与群で治療効果が示された。さらに治療実験後の動物組織にて、その効果を免疫染色等による組織学的検討、QPCR を用いた炎症性および細胞保護性分子の遺伝子発現解析、M1 および M2 ミクログリアの細胞集団の変化についての検討を施行にて、M2 ミクログリアの増加、炎症抑制、神経保護効果を示し、M1 ミクログリアを標的とした miRNA の輸送にて M2 ミクログリアへの誘導および神経保護効果を示すことが証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Terashima T, Kobashi S, Watanabe Y, Nakanishi M, Honda N, Katagi M, Ohashi N, Kojima H	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancing the Therapeutic Efficacy of Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells with Growth Factor-Expressing Mesenchymal Stem Cells for ALS in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101764 - 101764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101764	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 Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Nakae Y, Okano J, Suzuki Y, Urushitani M, Kojima H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Transplantation of M2-deviated microglia promotes recovery of motor function after spinal cord injury in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 254-265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2019.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takamura H, Terashima T, Mori K, Katagi M, Okano J, Suzuki Y, Imai S, Kojima H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Bone marrow-derived mononuclear cells relieve neuropathic pain after spinal nerve injury in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 657-665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2020.03.020	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 Terashima T, Ogawa N, Sato T, Katagi M, Nakae Y, Okano J, Maegawa H, Kojima H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Advanced technology for gene delivery with homing peptides to spinal cord through systemic circulation in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Ther Methods Clin Dev	6. 最初と最後の頁 474-483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtm.2019.04.008	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 Wada A, Terashima T, Kageyama S, Yoshida T, Narita M, Kawauchi A, Kojima H	4. 巻 12
2. 論文標題 Efficient Prostate Cancer Therapy with Tissue-Specific Homing Peptides Identified by Advanced Phage Display Technology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Oncolytics	6. 最初と最後の頁 138-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2019.01.001	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 Ogawa N, Terashima T, Oka K, Chan L, Kojima H	4. 巻 3
2. 論文標題 Gene therapy for neuropathic pain using dorsal root ganglion-targeted helper-dependent adenoviral vectors with GAD67 expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PAIN Reports	6. 最初と最後の頁 e695-e695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PR9.0000000000000695	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 Terashima T, Nakae Y, Katagi M, Okano J, Suzuki Y, Kojima H	4. 巻 4
2. 論文標題 Stem cell factor induces polarization of microglia to the neuroprotective phenotype in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e00837 ~ e00837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2018.e00837	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 Terashima T, Ogawa N, Nakae Y, Sato T, Katagi M, Okano J, Maegawa H, Kojima H	4. 巻 11
2. 論文標題 Gene Therapy for Neuropathic Pain through siRNA-IRF5 Gene Delivery with Homing Peptides to Microglia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 203-215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2018.02.007	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14件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 寺島智也, 小橋修平, 櫻美和子, 中江由希, 岡野純子, 大橋夏子, 鈴木義久, 小島秀人
2. 発表標題 IL-4 誘導ミクログリア細胞移植による脊髄損傷への治療戦略
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島秀人, 櫻美和子, 大橋夏子, 寺島智也, 岡野純子, 中江由希, 鈴木義久
2. 発表標題 高血糖は造血幹細胞に病的記憶を残す
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺島智也
2. 発表標題 先端技術を駆使した糖尿病末梢神経障害に対する次世代型治療への展望
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会総会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terashima T, Kobashi S, Watanabe Y, Nakanishi M, Honda N, Katagi M, Nakae Y, Ohashi N, Urushitani M, Kojima H.
2. 発表標題 Combined bone marrow transplantation therapy of MNCs and growth factor expressing-MSCs for amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 The 30th Annual Meeting of the International Symposium on ALS/MND. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Nakae Y, Kojima H, Urushitani M.
2. 発表標題 Transplantation therapy of bone marrow-derived M2 microglia-like cells on ALS model mice.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺島智也
2. 発表標題 骨髄由来細胞の遊走性および標的化を応用した神経疾患への分子治療戦略
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺島智也、小橋修平、渡辺保裕、中西真実、櫻美和子、中江由希、岡野純子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 骨髄単核球および神経栄養因子群発現骨髄間葉系幹細胞併用骨髄移植による筋萎縮性側索硬化症への治療戦略
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺保裕、本多直人、中西真実、足立麻由香、寺島智也、花鳥律子
2. 発表標題 細胞シート状態で大脳へ移植した間葉系幹細胞の生着に関する因子の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阪井田哲、寺島智也、櫻美和子、中江由希、岡野純子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 実験的脳損傷モデルマウス作成の試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻美和子、寺島智也、中江由希、岡野純子、鈴木義久、小島秀人
2. 発表標題 糖尿病性神経障害の完治に向けた新規治療標的の同定
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島秀人、櫻美和子、寺島智也、岡野純子、中江由希、鈴木義久
2. 発表標題 糖尿病性神経障害は神経細胞に細胞融合を仕掛ける造血幹細胞疾患である
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Terashima T, Ogawa N, Nakae Y, Katagi M, Okano J, Kojima H.
2. 発表標題 Gene therapy for neuropathic pain through siRNA delivery with homing peptides to microglia.
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobashi S, Terashima T, Nakae Y, Katagi M, Kojima H, Urushitani M.
2. 発表標題 Development of an effective technology for inductive differentiation from bone marrow-derived mononuclear cells to neuroprotective microglia.
3. 学会等名 The 21st Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Terashima T, Ogawa N, Nakae Y, Sato T, Katagi M, Okano J, Maegawa H, Kojima H.
2. 発表標題 A novel strategy for gene therapy for neuropathic pain through siRNA-IRF5 with homing peptides to microglia.
3. 学会等名 The 21st Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy. (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学 生化学分子生物学講座 再生修復医学部門 https://www.shufuku.net/

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
研究協力者	小橋 修平 (Kobashi Syuhei)	滋賀医科大学 (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	小島 秀人 (Kojima Hideto) (00225434)	滋賀医科大学 (14202)	
研究協力者	漆谷 真 (Urushitani Makoto) (60332326)	滋賀医科大学 (14202)	

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