

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07532

研究課題名(和文) 神経再生機能分子LOTUSによるALSの治療法開発

研究課題名(英文) Development of ALS therapy targeting LOTUS, a functional molecule for neuronal regeneration

研究代表者

田中 章景 (TANAKA, Fumiaki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30378012

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(ALS)では、ミエリン関連神経突起伸長阻害因子(MAIs)とその受容体であるNgR1を介したシグナル伝達が病態形成において果たす役割が注目されている。そこで、MAIsとNgR1の結合を阻害する分子であるLOTUSが、ALSの治療標的となりうるかを検討した。ALSモデルマウス(変異SOD1(G93A)マウス)とLOTUS過剰発現マウスを交配したところ、ALSモデルマウスの運動機能が改善し、生存期間も延長した。今後、この改善の機序を解析するとともにLOTUSを標的としたALS治療法開発に取り組みたい。

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、運動ニューロンの障害により、数年で呼吸筋麻痺に至る致死的神経難病である。現在までのところ満足のいく治療法は開発されておらず、疾患の克服は喫緊の医学的課題である。治療法の開発には、ALSの病態を形成するキーとなる分子を標的とした創薬が求められるが、我々はLOTUSに着目した。ALSの病態には「神経変性」と「神経炎症」の二つの側面があるが、LOTUSはこれらを同時に制御しうる分子と考えられ、本研究により得られたLOTUSの治療効果は、今後の研究発展によりALSの克服に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), the role of signal transduction via myelin-related neurite outgrowth inhibitors (MAIs) and their receptor NgR1 is attracting attention as its pathogenesis. Therefore, we investigated whether LOTUS, a molecule that inhibits the binding of MAIs and NgR1, could be a therapeutic target for ALS. Mating ALS model mice (mutated SOD1 (G93A) mice) with LOTUS transgenic mice improved motor function and prolonged survival of ALS mice. We will investigate the mechanism of this improvement and work on the development of ALS treatment targeting LOTUS.

研究分野：神経内科学

キーワード：ALS LOTUS Nogo PIR-B

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の病態機序の一つである運動ニューロンの軸索変性機序に、ミエリン関連神経突起伸長阻害因子の代表的分子である Nogo とニューロン上の Nogo 受容体である NgR1 によるシグナル伝達による神経突起伸長阻害作用が関わっていることが判明している。Nogo-NgR1 シグナル伝達の抑制による治療の可能性は、SOD1 Tg マウスを Nogo ノックアウトマウスと交配すると、運動ニューロン変性が抑制され生存期間が延長するという報告で最初に示され (Jokic N et al. EMBO Rep 2006)、ALS 患者においても Nogo の神経筋接合部における発現亢進が認められた。また、NgR1 はミクログリアや T リンパ球などの免疫系細胞にも発現しており、神経炎症の惹起による ALS の病態進展への関与も想定されている。そこで、Nogo 中和抗体 (ozanezumab) の開発・治療応用が進められ SOD1 Tg マウスでの治療効果が報告されたが (Bros-Facer V et al. Hum Mol Genet 2014)、臨床試験では有効性が示されなかった (Meininger V et al. Lancet Neurol 2017)。その原因として、薬剤の中枢移行性の乏しさが想定され、また、Nogo 以外の NgR1 のリガンドとして他に 4 つの分子が存在することから、Nogo だけを標的としても NgR1 シグナル伝達を抑制することが難しいことも明らかになってきた。そこで、我々は Nogo を含む NgR1 のすべてのリガンドとの結合を阻害し軸索伸長を促進するとともに、ミクログリアや T リンパ球などの免疫系細胞にも作用する内因性 NgR1 阻害因子である LOTUS に着目した。

2. 研究の目的

我々は、LOTUS を標的に疾患研究への応用をすすめ、多発性硬化症 (Takahashi K et al. JAMA Neurol 2015, Neurodegener Dis Manag 2015, Clin Exp Neuroimmunol 2015)、髄膜炎 (Takahashi K et al. J Neuroinflammation in revision) などにおける病態への関与、治療効果を示してきた。また、我々はこれまでに末梢免疫を担う T リンパ球に対する LOTUS の機能を明らかにしており、さらに中枢神経の免疫を担うミクログリアの NgR1 に対しても Nogo との結合を阻害することを確認している。従って、LOTUS は軸索伸長を介した運動ニューロンへの保護的作用に加え、ミクログリアによる異常な炎症の惹起に対しても病態を改善する生理活性を有することが強く示唆される。我々が明らかにしてきたこれらの知見と研究基盤に基づき、本研究では神経機能分子 LOTUS を標的とし、ALS の中心的な 2 つの病態、すなわち「神経変性」と「神経炎症」を同時に制御しうるこれまでにない強力な画期的な新規治療法の開発を推進することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は変異 SOD1 (G93A) マウスに加え、LOTUS 過剰発現マウス及び LOTUS 欠損マウスを保有している。これらの LOTUS 遺伝子改変マウスを変異 SOD1 マウスと交配し、生存率に加えロータロッド、フットプリントなどの運動機能解析を行い、LOTUS の個体レベルにおける表現型修飾効果を明らかにする。さらに、これらの脊髄運動ニューロンにおける運動ニューロン数を含む病理変化に加え、神経筋接合部の形態変化、病変における活性化ミクログリア、炎症性物質の産生、T リンパ球の浸潤についての評価を行う。さらに、変異 SOD1 (G93A) を導入した培養細胞においてリコンビナント LOTUS を加え、その生存率や神経突起の長さを定量化することで LOTUS の神経保護作用を明らかにする。

4. 研究成果

LOTUS 欠損変異 SOD1(G93A)マウスは、17-18 週頃より、運動機能の低下が見られ、変異 SOD1(G93A)マウスに比べて運動機能低下の速度がより速いことが明らかとなった。一方、LOTUS 過剰発現 SOD1(G93A)マウスにおいて、ロタロッドテスト、ワイヤーハングテストによる運動機能解析を進めた結果、15 週目頃から LOTUS 過剰発現変異 SOD1 マウスは変異 SOD1 マウスに比べて有意な運動機能の改善を認めるとともに、生存期間は中央値で 15 日の延長を示し、中には 40-50 日の延長を示すマウスも存在した。また、LOTUS 過剰発現変異 SOD1 マウスにおける LOTUS 発現が終末期においても保たれているかを確認したところ、内因性 LOTUS のみを発現する変異 SOD1 マウスに比べて約 3 倍の発現量を保っていた。現在、NeuN, ChaT, Iba-1, GFAP による脊髄の運動ニューロン数およびグリア増生についての病理解析を行っており、preliminary には、LOTUS 過剰発現変異 SOD1 マウスでは変異 SOD1 マウスに比べて運動ニューロン数の維持、グリア増生の増加が見られている。また、神経筋結合部の形態に及ぼす影響についても、NMJ の評価法を確立し評価を開始した。さらに、変異 SOD1(G93A)を導入した培養細胞においてリコンビナント LOTUS を加え、その生存率や神経突起の長さを定量化した。リコンビナント LOTUS の精製、神経突起長の定量法などの技術には問題がなかったが、アッセイの結果、LOTUS を加えない群との間で差異を検出することはできなかった。この原因を検討したところ、この培養細胞に NgR1 の発現が見られないことが明らかとなり、現在、神経初代培養を使った実験を行っている。さらに、両マウスにおける MAIs の発現量の比較検討を行った。NgR1 シグナルの下流に位置する分子についても、その変動を確認中である。また、研究実施期間中に MAIs の受容体として NgR1 以外に PIR-B の存在が報告され、LOTUS は PIR-B に対しても MAIs の結合を阻害することがわかっているため、グリアを含む中枢神経系細胞における PIR-B の発現を確認中である。これらの解析により、ALS における LOTUS の神経保護、病態改善機構を明らかにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Suzuki K, Ogasawara A, Takahashi K, Azuma YT, Doi H, Tanaka F.	4. 巻 14
2. 論文標題 Ablation of interleukin-19 improves motor function in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00785-8	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 Kubota S, Doi H, Koyano S, Tanaka K, Komiya H, Katsumoto A, Ikeda S, Hashiguchi S, Nakamura H, Fukai R, Takahashi K, Kunii M, Tada M, Takeuchi H, Tanaka F.	4. 巻 14
2. 論文標題 SGTA associates with intracellular aggregates in neurodegenerative diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-021-00770-1	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 Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Hatooka Y, Takahashi K, Katsumoto A, Kubota S, Nakamura H, Kunii M, Tada M, Doi H, Tanaka F.	4. 巻 13
2. 論文標題 CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00607-3	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 Hayashi N, Doi H, Kurata Y, Kagawa H, Atobe Y, Funakoshi K, Tada M, Katsumoto A, Tanaka K, Kunii M, Nakamura H, Takahashi K, Takeuchi H, Koyano S, Kimura Y, Hirano H, Tanaka F.	4. 巻 160
2. 論文標題 Proteomic analysis of exosome-enriched fractions derived from cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis patients.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosci Res	6. 最初と最後の頁 43-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neures.2019.10.010	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 Takahashi K, Takeuchi H, Kurihara Y, Doi H, Kunii M, Tanaka K, Nakamura H, Fukai R, Tomita-Katsumoto A, Tada M, Higashiyama Y, Joki H, Koyano S, Takei K, Tanaka F.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid level of Nogo receptor 1 antagonist lateral olfactory tract usher substance (LOTUS) correlates inversely with the extent of neuroinflammation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-018-1084-x	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 Tada M, Doi H, Koyano S, Kubota S, Fukai R, Hashiguchi S, Hayashi N, Kawamoto Y, Kunii M, Tanaka K, Takahashi K, Ogawa Y, Iwata R, Yamanaka S, Takeuchi H, Tanaka F.	4. 巻 188
2. 論文標題 Matrin 3 Is a Component of Neuronal Cytoplasmic Inclusions of Motor Neurons in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 507-514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.10.007	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	高橋 慶太 (Takahashi Keita) (20773740)	横浜市立大学・附属病院・助教 (22701)	
研究分担者	土井 宏 (Doi Hiroshi) (10326035)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	竹内 英之 (Takeuchi Hideyuki) (30362213)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	

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
---------	---------