

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07822

研究課題名(和文)代謝血流制御による筋萎縮性側索硬化症新規治療法開発

研究課題名(英文) Treatment strategy of amyotrophic lateral sclerosis focusing on controlling spinal blood flow and metabolism

研究代表者

多田 智 (TADA, Satoru)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70626530

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)：先行研究で確認した新規血管拡張剤(ONO1301)の奏功メカニズムを更に確認するために、低酸素誘導分子であるHIF1aの下流分子の一つであるHSP70を免疫染色で確認した。具体的にはONO1301投与ALSモデルマウス並びに対象治療群マウスの脊髄でのHSP70の発現を比較した。ONO1301による血流改善効果を反映して、ONO1301群ではHSP70シグナルの低下を認めた。これらの知見に基づき、すでに血管拡張作用を有する薬剤として臨床応用がなされている経口血管拡張薬XをALSモデルマウスに投与することにより、同様の神経保護効果が見られるかどうかを検討した。

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(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)は、疾患進行を抑制する根治療法の存在しない神経変性疾患である。人工呼吸器がなければ、患者は発症後3-5年で呼吸不全のため死去するため、その治療法の開発が喫緊の課題である。現在保険適応を受けている治療は2種類存在するが、いずれも患者の生存期間を延長する効果はない。我々の知見により、これらの治療法に加えて血管拡張療法が臨床的に有用である可能性が示唆され、患者寿命を進展できる可能性を見出したことが、本研究の最大の意義である。

研究成果の概要(英文)：To further confirm the mechanism of response to the novel vasodilator (ONO1301) identified in the previous study, HSP70, one of the downstream molecules of HIF1a, a hypoxia-inducing molecule, was confirmed by immunostaining. Specifically, we compared the expression of HSP70 in the spinal cord of ALS model mice treated with ONO1301 and the target treatment group mice, and found that HSP70 signal was reduced in the ONO1301 group, reflecting the improvement in blood flow induced by ONO1301. Based on these findings, the investigators sought to determine whether oral vasodilator X, which is already in clinical use as a vasodilator, could exert a similar neuroprotective effect in ALS model mice.

研究分野：神経内科学

キーワード：運動神経変性 運動ニューロン疾患 低酸素 低灌流 血管拡張

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ALS は主に中年以降に発症し、脊髄の運動神経細胞を選択的かつ不可逆進行性に障害する致死性疾患である。ALS 発症の原因として興奮性アミノ酸説、ミトコンドリア機能異常説、酸化ストレス説、栄養因子欠乏説などが想定されているが、未だその詳細は不明である。現在グルタミン酸受容体拮抗薬であるリルゾールと、フリーラジカルスカベンジャーであるエダラボンが ALS 治療に臨床応用されているが、患者の生命予後を改善させるには至っておらず、新規治療法の開発が切望されている。

ALS では運動神経細胞死に先立ってグリア細胞などの非運動神経細胞の活性化が見られることから、現在では ALS における運動神経細胞死には非運動神経細胞が大きく関わっていると考えられている。更に、モデルマウスやヒト剖検検体を用いた検討で、運動神経細胞死に先立って脊髄微小血管の内皮細胞の破綻が起こることや脊髄組織の虚血・低酸素状態が起こることが明らかとなり、結果的に生ずる低栄養状態・血流不全・低酸素状態が運動神経細胞死を加速している可能性がある。ALS 患者では病初期から代謝が亢進していることが明らかになっており、亢進した代謝要求を満たすための高炭水化物食の摂取により ALS 患者の生命予後が改善することが近年示されている (Amyotrophic Lateral Sclerosis (2012) 13(4) 363-366、Lancet 383: 2065-2072, (2014))。血流については、血管内皮細胞を修復した ALS マウスでは神経変性が抑制されることが示されており、(PNAS 111, E1035-E1042 (2014)、JCI 119, 3437-3449 (2009))血管変性や血管内皮細胞・周皮細胞が神経変性に与える影響がますます重要視されている。我々は先行研究で ALS モデルマウスの脊髄で血管内皮細胞のマーカーである CD31 陽性の細小血管が多数認められる ALS モデルマウス及びヒト ALS 患者の脊髄検体を用いた免疫染色では ALS 群で低酸素マーカーである HIF1 の発現が上昇している 血管拡張作用を有するプロスタサイクリンアゴニストである ONO1301 投与により代謝血流が改善し ALS マウスの神経変性が抑制できることを示しており、ALS の病態に低酸素が関連していること、並びに低栄養状態、低酸素状態・血流不全を改善することにより ALS 治療が可能になるという重要な知見であると考えている。

以上のように、ALS における運動神経細胞死カスケードの上流に低栄養・低血流・低酸素が位置していることはほぼ間違いないが、これらの病態がどの病期の神経細胞死にどの程度関与しているのかについては、決定的な答えは得られていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ALS における運動神経細胞死に対して、低栄養・慢性虚血・低酸素がどの病期にどの程度関連しているのかを明らかにし、代謝改善・血流増加・低酸素改善によって運動神経細胞死を防止することができるのかどうか確かめることである。

現在のところ、ALS における運動神経細胞死の主要なメカニズムとして、1) 神経細胞内蛋白の異常凝集 2) 神経細胞内 RNA 代謝異常及び RNA 結合蛋白との相互作用異常 3) 軸索輸送異常 4) 神経細胞核-細胞質シャトル異常 5) DNA 修復異常 6) 神経細胞内小胞輸送障害 7) グルタミン酸毒性 8) 神経細胞ミトコンドリア障害 9) ミクログリア・アストロサイトによる神経炎症 10) オリゴデンドロサイト異常等が想定されている。一方で、代謝亢進・慢性虚血・低酸素が運動神経細胞死に与える影響を直截的かつ包括的に評価した研究は今までに無く、脊髄血流増加・低酸素改善を目標とした ALS 治療薬開発も独創性が高い。慢性虚血・低酸素による運動神経細胞死は、上記の 10 のメカニズムとは独立して起こっている可能性が高いため、これをターゲットとする治療を開発することにより、既存の治療薬と併用して運動神経細胞死抑制効果を更に高

めることが可能になる。

3. 研究の方法

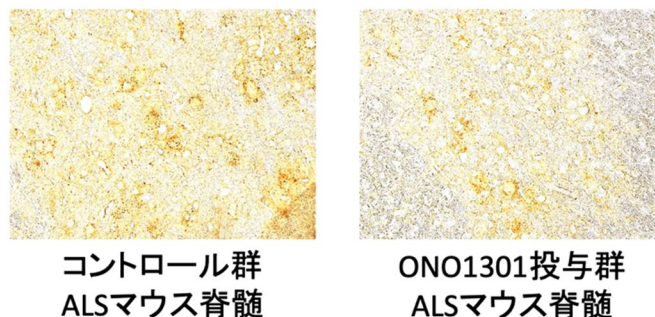
- (1) 先行研究で認められていた、血管拡張剤（プロスタグランジン I2 アゴニスト、ONO1301）による ALS 神経変性抑制効果のメカニズムを詳細に検討するため、HIF1a の下流分子である HSP70 の発現を、ONO1301 投与群 ALS モデルマウス並びにコントロール群で比較した。具体的には、生後 64 日齢のヒト変異 SOD1(G93A)トランスジェニックマウス（メス）に ONO1301 を投与し、120 日齢で屠殺して脊髄を回収し凍結切片を作成した上免疫染色を行った。
- (2) ONO1301 による ALS モデルマウスにおける神経変性抑制効果を速やかに臨床現場に導入するために、同様の血管拡張作用を有することが知られている経口血管拡張薬 X を ALS モデルマウスに導入することにより、神経変性抑制が可能かどうか評価した。具体的には X 低用量群、X 高用量群と対照群を設定し、モデル動物の運動機能に対する影響をオープンフィールドテストで評価した。
- (3) 近年とりわけ腫瘍学分野で徐々に明らかになってきている、低酸素状態のミトコンドリアに対する影響について、脊髄における低酸素状態が髄液中のミトコンドリア DNA に与える影響を明らかにするために、ALS 患者とコントロール疾患群の患者髄液を分析し、ミトコンドリア DNA 量を比較した。具体的には、ミトコンドリア特異的遺伝子である COX3, ND1, ND6 のプライマを用いて QPCR を行い、患者髄液中に含まれているミトコンドリア DNA を定量した。ALS 患者並びにコントロール群(Other neurological diseases, OND)の内訳は以下の通り。

コントロール群 (n=13)	PSP 2 例、MSA 2 例、SCA 1 例、CBS 2 例、iNPH 4 例、somatic symptom disorder 2 例
ALS 群 (n=11)	possible 2 例, probable 9 例

4. 研究成果

- (1) ONO1301 投与群では HSP70 の発現・染色性がコントロール群と比較して著明に低下しており、ONO1301 による血管拡張作用により、ALS マウスの脊髄低酸素状態が解除され、HIF1a の低下に対応する形で、その下流の HSP70 の発現が抑制されたと考えられた(図 1)。

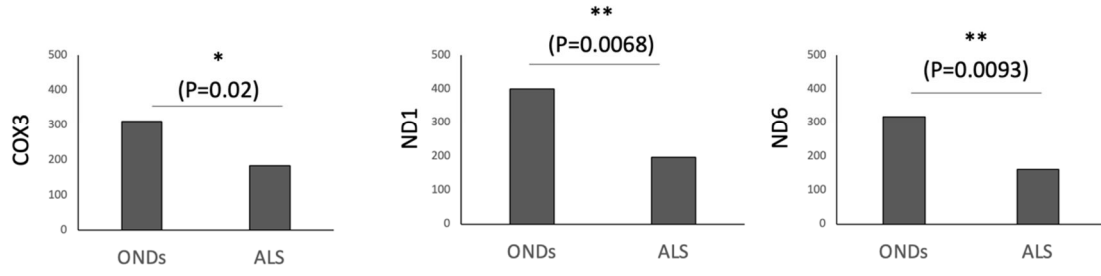
図1 HSP70 免疫染色



- (2) オープンフィールドテストで計測した運動量では、コントロール群、X 低用量群、X 高用量群で有意な差は認められなかった。今後更に動物数を増やした検討を行う予定としている。

- (3) 図 2 に示す如く、いずれのミトコンドリア遺伝子でも ALS 群で有意な低下を認め、ALS では髄液ミトコンドリアの放出が抑制されている可能性が示唆された。

図2 髄液ミトコンドリアDNA比較



Student's t-test, two-tailed; *P <0.05; **P <0.01; NS, not significant (P >0.05)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mikito Shimizu, Tatsusada Okuno, Makoto Kinoshita, Hisae Sumi, Harutoshi Fujimura, Kazuya Yamashita, Tomoyuki Sugimoto, Shuhei Sakakibara, Kaori Sakakibara, Toru Koda, Satoru Tada, Teruyuki Ishikura, Hisashi Murata, Shohei Beppu, Naoyuki Shiraishi, Yasuko Sugiyama, Yuji Nakatsuji, Atsushi Kumanogoh & Hideki Mochizuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial DNA enhance innate immune responses in neuromyelitis optica by monocyte recruitment and activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70203-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 該当する

1. 著者名 Koda Toru, Namba Akiko, Kinoshita Makoto, Nakatsuji Yuji, Sugimoto Tomoyuki, Sakakibara Kaori, Tada Satoru, Shimizu Mikito, Yamashita Kazuya, Takata Kazushiro, Ishikura Teruyuki, Murata Syo, Beppu Shohei, Kumanogoh Atsushi, Mochizuki Hideki, Okuno Tatsusada	4. 巻 17
2. 論文標題 Sema4A is implicated in the acceleration of Th17 cell-mediated neuroinflammation in the effector phase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 1,9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-020-01757-w	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Satoru Tada, Benoit Souchet, Sandro Alves, Romain Fol, Nicola S. Orefice, Nathalie Cartier, Jerome Braudeau, Hideki Mochizuki
2. 発表標題 APP Processing Drives Gradual Tau Pathology in an Age-Dependent Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease
3. 学会等名 日本遺伝子治療学会
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	奥野 龍禎 (Okuno Tatsusada) (00464248)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	清水 幹人 (Shimizu Mikito) (30817507)	大阪大学・医学部附属病院・医員 (14401)	

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