

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16363

研究課題名（和文）疾患特異的なミトコンドリア動態を制御する新たな治療戦略の開発

研究課題名（英文）Developing a novel therapeutic approach by regulating disease-specific mitochondrial fragmentation

研究代表者

田中 智弘（Tanaka, Tomohiro）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・新分野創成センター・特任助教

研究者番号：00812760

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ミトコンドリアの断片化は家族性・孤発性の筋萎縮性側索硬化症（ALS）に共通して認められる病態であるため、より多くの患者の治療を可能にする普遍的な標的として注目されている。本研究課題では1）ALSのミトコンドリアの断片化に寄与するタンパク質間相互作用の同定 2）その相互作用を抑制する薬剤の同定を目指した。

本研究によって、ALSモデルマウスの脊髄ではDrp1とFilamin Aの相互作用が促進していることが明らかとなった。また、Drp1-Filamin A相互作用を抑制する化合物シルニジピンを発症後に連続投与したところ、ALSモデルマウスの生存期間が有意に延長された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSに対する有効な治療法は未だ開発されていない。ミトコンドリアの断片化を担うタンパク質Drp1はALS患者に共通する治療標的として有力視されてきたが、Drp1自身の活性を阻害する薬はミトコンドリアの生理的な分裂をも阻害してしまうため、長期にわたる病理進行への適応は難しいという背景があった。

本研究ではALS病態への選択性をもち、かつ家族性から孤発性患者まで広く適用できる治療標的の可能性を示した点、またそれが既承認薬で実現されうる可能性を示した点において、適応拡大などの社会的意義をもつ。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial fragmentation is a hallmark pathology in both familial/sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS), attracting attention as a key therapeutic target. Our aim was 1) to identify protein-protein interaction that specifically contributes to mitochondrial fragmentation in ALS, 2) to identify a drug that inhibits this interaction. We show that Drp1-Filamin A interaction was promoted in the spinal cord of ALS model mice. Furthermore, post-symptomatic administration of Cilnidipine, a compound that inhibits Drp1-Filamin A interaction, significantly extended the life span of ALS model mice.

研究分野：組織形態学

キーワード：ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に対する有効な治療法は未だ開発されていない。これまでに多くの ALS 原因遺伝子が同定されたが、それらでは説明のつかない孤発性の症例は 90% にのぼる。その一方で、ミトコンドリアの過剰な分裂は家族性・孤発性 ALS の症例に共通して認められる病態であるため、より多くの患者への治療を可能にする標的として注目されている。とくに Dynamin-related protein 1 (Drp1) と呼ばれる GTP 結合タンパク質は、その活性を駆動力としてミトコンドリアの分裂を担う中心的な分子であり、治療標的として有力視されてきた。しかし Drp1 自身を標的とする阻害薬はミトコンドリアの生理的な分裂をも阻害してしまうため、長期にわたる病理進行への適応は難しいという学術的背景があった。

(2) ミトコンドリアの分裂過程は、Drp1 以外にもさまざまな分子が関与しながら段階的に進行することが近年明らかになりつつある。これまでに私たちは心筋梗塞モデルマウスを用いた研究から、酸素分圧の低下する梗塞周辺領域の心筋細胞において Drp1 の活性が亢進することを見出した。さらにプロテオーム解析によって、低酸素に曝露された細胞では Drp1 と Filamin A (アクチン結合タンパク質) とのタンパク質間相互作用が促進されることを見出し、低酸素によるミトコンドリアの断片化は Filamin A 特異的に引き起こされることを明らかにした。また化合物シルニジピンは Drp1-Filamin A 相互作用を抑制し、心筋梗塞モデルの症状が有意に改善することが判明している。

2. 研究の目的

(1) ALS 病態特異的に Drp1 と相互作用し、その活性を制御するような分子を同定する。

(2) 上記の相互作用を抑制する化合物を同定する。

3. 研究の方法

(1) ALS モデルである SOD1-G93A tg マウス (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) を用い、脊髄における Drp1-Filamin A 相互作用を proximity ligation assay (PLA) によって免疫組織化学的に可視化・定量化した。

(2) Drp1-Filamin A 相互作用を抑制する化合物シルニジピンを 発症前 (P60) および 発症時 (P100) の SOD1-G93A tg マウスにそれぞれ投与し、下位運動ニューロンの骨格筋からの脱神経、および 生存期間を評価した。

4. 研究成果

(1) ALS 患者および SOD1-G93A tg マウスに共通して、発症前にミトコンドリアの断片化を呈することが分かっている。そこでミトコンドリアの断片化に伴って Drp1-Filamin A (以下 FLNa) 相互作用が増強するか検討するため、proximity ligation assay (PLA) によって Drp1 と Filamin A の近接化を可視化し、運動ニューロン内に観察される PLA 陽性のドット状シグナル数を定量評価した。

その結果、図 1 に示すように、野生型 (WT) に比べ SOD1-G93A tg マウスの

運動ニューロンでは ChAT 陽性の運動ニューロンにおいて PDH 陽性のミトコンドリア長が有意に減少していることが確認され、さらに Drp1-FLNa の PLA ドット数が有意に増加していることが判明した。ただし PLA ドット数の増加傾向は運動ニューロンに限らず脊髄前角全体に認められたため、ALS における Drp1-FLNa 相互作用の増強は運動ニューロンに特異的でないこ

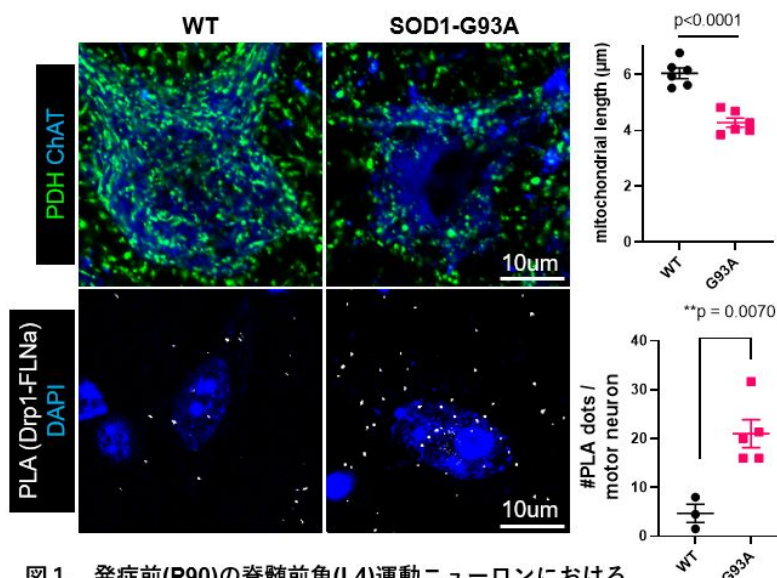


図1 発症前(P90)の脊髄前角(L4)運動ニューロンにおけるミトコンドリア長とDrp1-Filamin A相互作用の定量解析

とが示唆された。

(2) シルニジピンの SOD1-G93A tg マウスに対する薬効評価

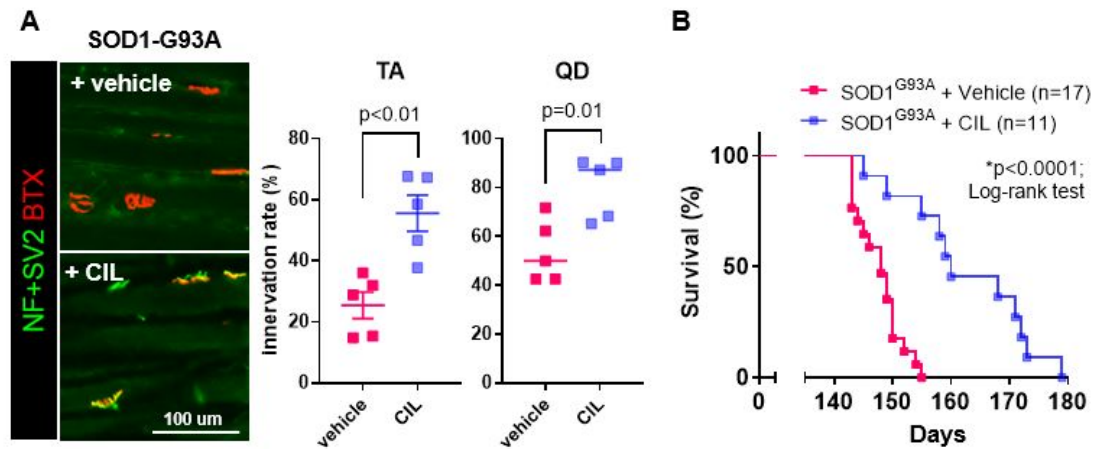


図2 シルニジピンのSOD1-G93A tgマウスへの投与による病態進行への影響

(A) 運動ニューロン軸索末端の骨格筋への支配率 (P60-P90連続投与) (B) 生存日数 (P100-P130連続投与)

ALS 患者および SOD1-G93A tg マウスに共通して、発症前に運動ニューロンの軸索末端が骨格筋から退縮する脱神経と呼ばれる現象が知られている。Drp1-FLN_a 相互作用を抑制するシルニジピンが脱神経の進行過程に与える影響を検討するため、P60-P90 の期間に浸透圧ポンプを用いてシルニジピンを連続投与し、P90 での神経支配率 (innervation rate %) を評価した。その結果、Tibialis Anterior や Quadriceps などの骨格筋において、シルニジピン投与群の神経支配率は vehicle 投与群に比べ有意に増加した (図 2A)。

さらにシルニジピン投与による SOD1-G93A tg マウスの生存日数への影響を評価するため、P100-P130 の期間に連続投与し、生存率を評価した。その結果、シルニジピン投与群では vehicle 投与群に比べ、有意に生存率が高かった (図 2B)。

以上の結果から、シルニジピンは ALS モデルマウスにおける発症前の運動ニューロン変性を抑制し、生存期間を延長させることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishiyama Kazuhiro, Numaga Tomita Takuro, Fujimoto Yasuyuki, Tanaka Tomohiro, Toyama Chiemi, Nishimura Akiyuki, Yamashita Tomohiro, Matsunaga Naoya, Koyanagi Satoru, Azuma Yasu Taka, Ibuki Yuko, Uchida Koji, Ohdo Shigehiro, Nishida Motohiro	4. 巻 176
2. 論文標題 Ibutilast attenuates doxorubicin induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3 channel and NADPH oxidase 2 protein complexes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3723 ~ 3738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.14777	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 Nishimura Akiyuki, Shimoda Kakeru, Tanaka Tomohiro, Toyama Takashi, Nishiyama Kazuhiro, Shinkai Yasuhiro, Numaga-Tomita Takuro, Yamazaki Daiju, Kanda Yasunari, Akaike Takaaki, Kumagai Yoshito, Nishida Motohiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Depolsulfidation of Drp1 induced by low-dose methylmercury exposure increases cardiac vulnerability to hemodynamic overload	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaaw1920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aaw1920	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 Sudi Suhaini Binti, Tanaka Tomohiro, Oda Sayaka, Nishiyama Kazuhiro, Nishimura Akiyuki, Sunggip Caroline, Mangmool Supachoke, Numaga-Tomita Takuro, Nishida Motohiro	4. 巻 9
2. 論文標題 TRPC3-Nox2 axis mediates nutritional deficiency-induced cardiomyocyte atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46252-2	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 Nishiyama Kazuhiro, Toyama Chiemi, Kato Yuri, Tanaka Tomohiro, Nishimura Akiyuki, Nagata Ryu, Mori Yasuo, Nishida Motohiro	4. 巻 44
2. 論文標題 Deletion of TRPC3 or TRPC6 Fails to Attenuate the Formation of Inflammation and Fibrosis in Non-alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 431 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00903	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 西田基宏
2. 発表標題 筋萎縮性疾患治療薬を指向したエコファーマ研究
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------