

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15677

研究課題名（和文）ALS患者のメタボローム異常に注目したリバーストランスレーショナル病態解析

研究課題名（英文）Reverse translational analysis of metabolome abnormality in ALS

研究代表者

伊藤 大輔 (Ito, Daisuke)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20879944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis; ALS)は、運動ニューロンの変性により四肢、呼吸筋の筋力低下を引き起こし死に至る進行性の神経変性疾患である。本研究はALS患者の血清メタボローム解析で観察された進行速度に関連する代謝変化について、ALS細胞モデル、ALS動物モデルへの代謝調整薬剤投与により検討した。脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)阻害薬の一つをSOD1G93A変異導入マウスに投与したところ、神経炎症の調節を介した運動ニューロン保護効果、病態改善効果を見出した。これにより、エンドカンナビノイド代謝のALS進行病態への関与が明らかになった。

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、運動ニューロンの変性により四肢、呼吸筋の筋力低下を引き起こし死に至る進行性の神経変性疾患である。本研究はALS患者の血清メタボローム解析で観察された進行速度に関連する代謝変化について、ALS細胞モデル、ALS動物モデルへの代謝調整薬剤投与により検討したところ、エンドカンナビノイド代謝がALSの進行病態に関与することおよび治療標的となりうることを示した。本研究によりALSの病態解明と治療薬開発が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease characterized by motor neuron degeneration leading to weakness of limb and respiratory muscles and death. In this study, we investigated metabolic changes related to the rate of progression observed in serum metabolome analysis of ALS patients by administering metabolic modulators to ALS cellular and animal models. One of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors was administered to SOD1G93A transgenic mice and found to protect motor neurons through modulation of neuroinflammation. This study revealed the involvement of endocannabinoid metabolism in the pathogenesis of ALS progression.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 メタボローム解析 オミクス解析 リバーストランスレーショナル研究

1. 研究開始当初の背景

本研究における核心をなす学術的「問い」は、「孤発性 ALS 患者にみられる代謝 (メタボローム) 変化は ALS における病態の進行を規定しているか」である。

ALS は上位および下位運動ニューロンの選択的変性により、進行性の筋萎縮・筋力低下を呈し発症から 3-5 年で死にいたる難治性疾患である。これまでに動物モデルで効果を認めた多くの薬剤が臨床開発に進んだが、そのほとんどがヒトに対する効果を検証することができていない。これは、ALS の病態が複雑で治療標的が同定されていないこと、モデル動物が孤発性 ALS の病態を十分に反映していないこと、治療開始時にはすでに神経変性が進んでいること、などが原因であると考えられており、特に、ヒト病態で見出された変化を起点にヒト病態とモデル細胞・動物に共通する病態進行メカニズムを解明し、それを治療標的とする必要があると考えている。

ALS において原因遺伝子が同定されている家族例は 5% 程度に過ぎず、疾患の 90-95% を占めるのは孤発例である。本邦の家族性 ALS の約 20% は SOD1 遺伝子の変異を認める。一方、孤発性 ALS では病理学的に残存運動ニューロン内に TDP-43 陽性封入体を認め、TDP-43 の遺伝子異常が家族性 ALS の原因となることから、TDP-43 の ALS 病態への関与が示唆されている。ALS 患者では病初期から急激な体重減少を特徴とする代謝亢進状態が認められ、代謝亢進状態と進行速度との関連性が指摘されている (Steyn et al. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018)。また、TDP-43 が膵臓におけるインスリン分泌・糖代謝に関与することも示されており (Araki et al. *J Clin Invest*. 2019)、これらの知見は ALS が全身臓器の疾患であること、およびその病態に代謝異常が深く寄与していることを示唆している。研究代表者はこれまでに、ALS 発症早期に血清中クレアチンキナーゼ (CK) が上昇することを明らかにした (Ito et al. *J Neurol*. 2019)。CK は細胞内のエネルギー代謝に必須の分子であり、これらのことから、ALS 患者の代謝変化を解析することが ALS の病態解明および治療標的の発見につながると考えた。

そこで、ALS の病態進行に関わる代謝経路を同定すること、特に、ALS ヒト病態に根差し、ヒトとモデル細胞・動物で共通する病態の一端を明らかにし、種の壁を超えた新規治療法の標的を見出したいと考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、孤発性 ALS 患者の血清の網羅的メタボローム解析から得られた進行速度に関連する代謝異常の病態メカニズムを細胞・動物モデルで検証し、ヒトとモデル細胞・動物で共通する ALS 進行病態及び治療標的を発見することである。

予備的検討において発症早期、孤発性 ALS 患者の血清を用いたメタボローム解析を行い、キサントシン代謝・エンドカンナビノイド代謝を含め、ALS の進行速度に関わる、いくつかの代謝経路を同定した。これについて、ALS のモデル細胞 (TDP-43^{A315T} あるいは SOD1^{G93A} 変異を導入した NSC34 細胞) を用いて、代謝経路に介入しうる薬剤を 30 剤選定し、薬剤スクリーニングを行った。薬剤の効果は WST assay による細胞バイアビリティの評価を行い判定した。本研究では、その中で細胞バイアビリティの改善作用を認めた代謝調整薬剤を SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスに投与し、その薬効を評価するとともに、その薬効機序を検討することを通して、孤発性 ALS 患者で認められた進行速度を規定する代謝異常の病態生理を明らかにすることである。図 1 に薬剤スクリーニング結果の一部を示す。

3. 研究の方法

ALS モデルマウスである SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスを用い、運動ニューロン変性および、筋力低下をきたし、発症とみなされる、8 週齢から、餌に混入して薬剤の投与を開始し、体重、rotarod test により運動解析を行う。また、生存解析を行う。薬効の認められた薬剤については、その薬効機序を検討するために、SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの進行期と考えられる 16 週齢において解剖し、脊髄のサンプリングを行う。脊髄の病理標本を作成し病理標本の免疫

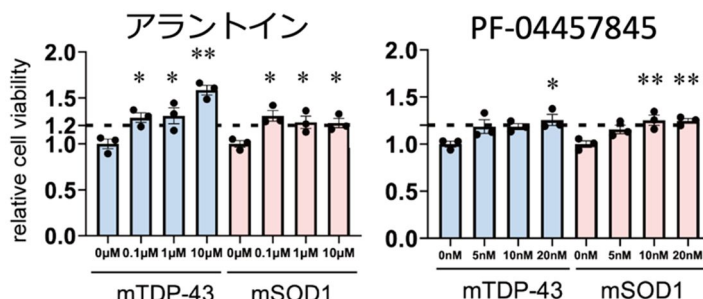


図 1 細胞モデルへの薬剤投与

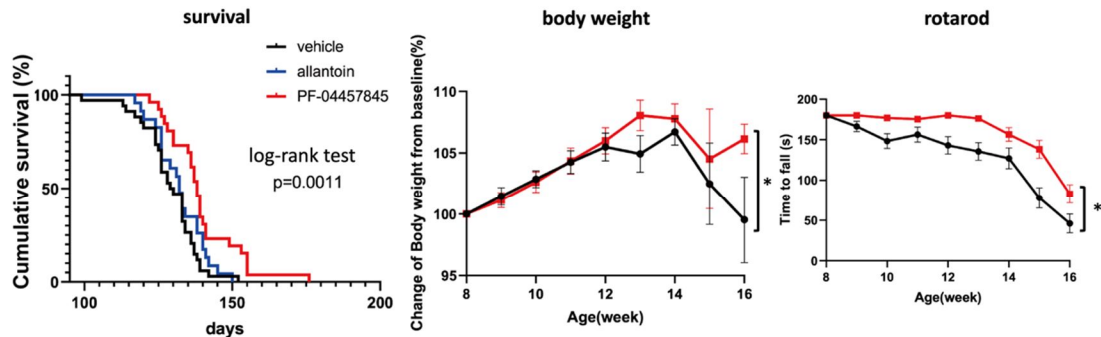


図 2. SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの生存・運動解析結果

染色により、運動ニューロン(ChAT)、グリア細胞(GFAP, Iba-1)の観察を行い、薬剤による病態改善効果を検討する。また脊髄のウェスタンブロット、RNA-sequence を行い、薬剤投与による遺伝子の発現変化を検討する。

4. 研究成果

まず、予備的検討で行った ALS 細胞モデルを用いた薬剤スクリーニングで最も効果を示したアラントインを SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスに投与した。アラントインはキサンチン代謝経路の下流末端に位置し、抗酸化作用を持つ物質である。アラントインを投与したところ、生存延長作用を認めなかった(図 2)。次に、アラントインの次に細胞バイアビリティ改善効果を認めた PF-04457845 を SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスに投与した。PF-04457845 の投与により SOD1^{G93A} トランスジェニックマウスの生存の延長効果が認められるとともに、体重の減少、運動機能低下の抑制作用が認められた。PF-04457845 は脂肪酸アミド加水分解酵素(FAAH)阻害薬の一つであり、投与により中枢神経におけるエンドカンナビノイドの分解が抑制され、したがって、エンドカンナビノイドが上昇する薬剤である。中枢神経におけるエンドカンナビノイド上昇による ALS 進行病態抑制作用の機序を明らかにするために、16 週齢における脊髄をサンプリングし、ChAT による免疫染色により運動ニューロンの観察を行ったところ、運動ニューロン変性の抑制作用が認められた(図 3)。また、GFAP, Iba-1 による免疫染色により、それぞれアストロサイトとミクログリアの観察を行ったところ、アストロサイトの増生の抑制効果が認められ、また、有意な差ではなかったものの、ミクログリアが抑制される傾向が認められた。よって、運動ニューロン保護効果の一端にグリア細胞による神経炎症が関わることを示唆された。そこで、さらに PF-04457845 の作用の分子生物学的な機序を同定するために、脊髄の RNA-seq を行い、変化する遺伝子群のパスウェイ解析を行った。パスウェイ解析ではサイトカインである IL-13 パスウェイの下流の遺伝子群の活性化が認められた(図 4)。IL-13 はミクログリアを細胞障害性の M1 ミクログリアから、細胞保護的な M2 ミクログリアへの極性変化を誘導し、神経炎症を調節することが知られている。またミクログリアに発現するエンドカンナビノイドのレセプターである CB2 レセプターの刺激により、ミクログリアの極性変化の誘導がもたらされることも報告されているため、PF-04457845 の運動ニューロン保護効果には、ミクログリアによる神経炎症の調節作用が関連している可能性を考えた。そこで、脊髄のウェスタンブロットを行い、まず、CB2 レセプターシグナルの下流である、ERK の発現を確認したところ PF-04457845 投与によりリン酸化 ERK の上昇が認められ、CB2 レセプターシグナルの変化が示唆された。次に、M1 ミクログリアのマーカーである CD86 と M2 ミクログリアのマーカーである CD36 の発現を確認したところ、M1 ミクログリアの減少と M2 ミクログリアの増加が認められた。

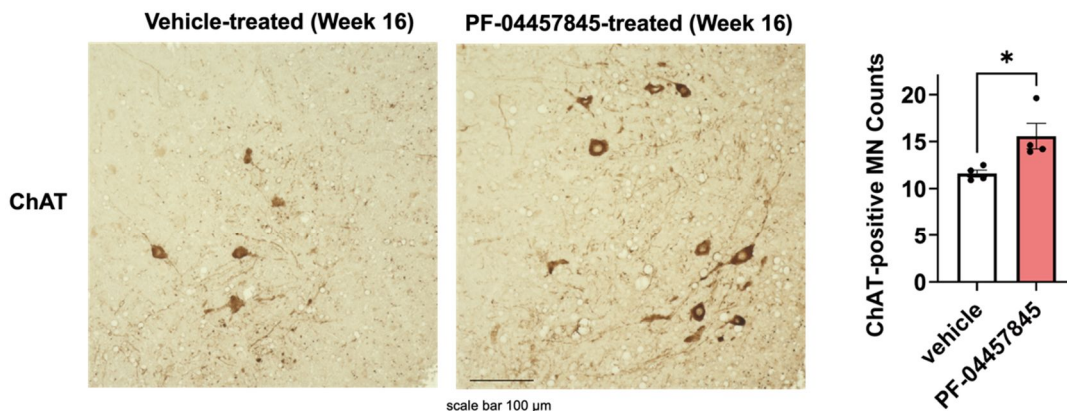


図3 PF-04457845による脊髄運動ニューロン保護作用

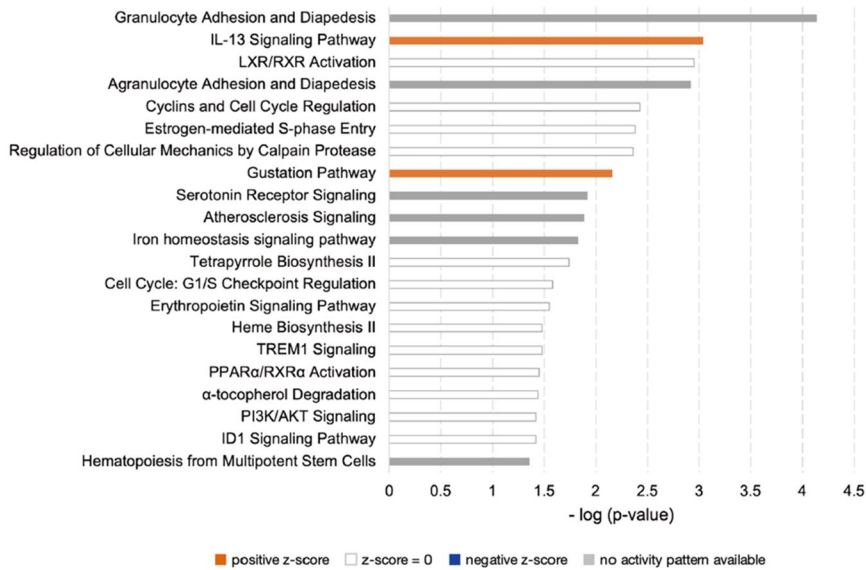


図4. 脊髄RNA-sequenceの結果

よって、PF-04457845 の投与により、マウス脊髄におけるエンドカンナビノイド類の上昇がもたらされた結果として、CB2 レセプターシグナルや IL-13 シグナルの活性化を介して、M1 ミクログリアから M2 ミクログリアへの極性変化がもたらされたことが、運動ニューロンの保護効果および、生存延長効果、運動機能悪化の抑制効果の分子メカニズムの一部であることを明らかとなった。

図 5 に ALS 患者血清のメタボローム解析で認められたエンドカンナビノイド代謝の変化を示す。急速進行 ALS 患者(R)では緩徐進行 ALS(S)に比して、血清エンドカンナビノイド類が上昇し、かつ進行速度とエンドカンナビノイド濃度との間に相関関係を認めた。すなわち、血清エンドカンナビノイド濃度が高いほど ALS の進行が速いことを意味している。この結果のみでは、血清エンドカンナビノイドの上昇が ALS 病態を加速させる因子であるのか、あるいは、ALS の進行病態に対して、代償的・防御的な生体反応を示しているのかを判別することはできない。本研究の特色は、臨床研究でみられた変化を、基礎医学研究のレベルで検討することで解釈を行うリパーストランスレーショナル・リサーチの手法を用いている点である。すなわち、ALS 細胞モデル・ALS 動物モデルへの FAAH 阻害薬投与と実験を通して明らかになった中枢神経でのエンドカンナビノイド上昇による ALS 病態改善効果を踏まえて、ALS 患者血清メタボローム解析の結果を解釈すると、急速進行 ALS 患者での血清中エンドカンナビノイドの増加は、ALS 進行病態に対する生体防御的反応をみている可能性が示唆された。これは、本研究の特徴的な成果であると考えられる。

本研究では、ALS 患者の血清メタボローム解析で認められた代謝変化のうち、エンドカンナビノイド代謝について、ALS 細胞モデル、動物モデルに対して、FAAH 阻害薬の一種を投与し検討したところ、エンドカンナビノイドの上昇には、ミクログリアにおける神経炎症調節を介した ALS 病態の改善作用があることが明らかになった。このことから、ALS 進行病態にエンドカンナビノイド代謝に関連した神経炎症が関わっていると同時に、エンドカンナビノイド代謝が ALS 病態治療の標的となることが示された。

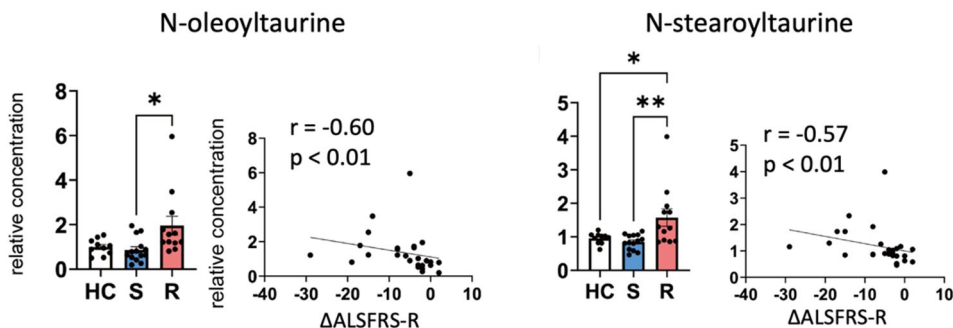


図5. ALS患者血清のエンドカンナビノイドの変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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