

令和 5 年 6 月 7 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：21K15693

研究課題名（和文）球脊髄性筋萎縮症におけるClチャンネル機能障害の病態解明と治療法開発

研究課題名（英文）Pathophysiology of Cl channel dysfunction and development of symptomatic therapy in spinal and bulbar muscular atrophy

研究代表者

山田 晋一郎（Yamada, Shinichiro）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60828375

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、SBMAの骨格筋におけるClチャンネル発現低下に伴うNa電流異常に着目し、モデルマウスに対してメキシレチン塩酸塩を投与することで運動解析や生存解析を行い、治療標的としての妥当性を検証し、同時に、患者から得られる生体試料と臨床情報を解析し、病態を反映するバイオマーカーを同定することである。SBMAのモデルマウスにメキシレチン塩酸塩を経口投与あるいは腹腔内投与して運動解析や生存解析を行った結果、メキシレチン塩酸塩投与群において握力の改善や生存期間の延長を認め、横紋筋特異的に発現する蛋白質であるTitinは、運動ニューロン疾患とくにSBMA患者において尿中Titin値が上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、モデルマウスの基礎的研究を通じて明らかになった疾病の分子メカニズムと多数の患者レジストリーから得た神経症状のバイオマーカーを一元化してSBMAの骨格筋病態とイオンチャンネルの関与の一端を明らかにし、同病態に対するメキシレチン塩酸塩の効果を裏付けた。SBMAと同様に運動ニューロンが障害される筋萎縮性側索硬化症においても、イオンチャンネルの障害が神経の過興奮性を惹起し、病態の進展に關与する可能性が指摘されていることから、世界各地でイオンチャンネルに着目した骨格筋変性メカニズムの解明研究が行われており、今後の神経変性疾患に対する治療法開発のモデルとなることも期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to investigate the validity of mexiletine hydrochloride as a therapeutic target by focusing on the abnormal Na current associated with reduced Cl channel expression in the skeletal muscle of SBMA. We simultaneously aimed to identify biomarkers reflecting neuromuscular degeneration by integrating and analysing biological samples and clinical information obtained from the patients of SBMA. Mexiletine hydrochloride was administered orally or intraperitoneally to mice models of SBMA to perform motor and survival analyses, which showed improved grip strength and prolonged survival in the Mexiletine hydrochloride-treated group. Urinary levels of N-terminal titin fragment normalised with urinary creatinine levels were higher in motor neurone disease, particularly in patients with SBMA. Our results suggest that ROC analysis of the urinary titin/Cr to discriminate patients with ALS from those with SBMA.

研究分野：神経筋疾患

キーワード：球脊髄性筋萎縮症 Clチャンネル メキシレチン塩酸塩 リバーストランスレショナルリサーチ イオンチャンネル Titin

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症（spinal and bulbar muscular atrophy, SBMA）は、球麻痺および四肢筋力低下を主症状とする、成人発症の緩徐進行性神経変性疾患である。X染色体上に存在するアンドロゲン受容体（androgen receptor, AR）遺伝子におけるCAG繰り返し塩基配列の異常伸長を病因とし、神経細胞核内で変異AR蛋白質が凝集し、イオンチャネルを含むさまざまな遺伝子の転写障害を惹起する。変異AR蛋白質の凝集を抑制する抗アンドロゲン療法（リュープロレリン酢酸塩）のSBMAに対する効能が承認され、臨床で広く使用されるに至ったが、これまでの臨床試験では筋力低下を改善する効果は認められておらず、患者のADLを向上させるには新たな治療法の開発が必要である。しかし、変異ARがどのように神経・筋の変性を起こすのかについてはほとんど明らかになっておらず、その病態機序を解明することが、SBMAの病態や治療を考える上で必須と考えられる。

また、神経変性疾患では、動物実験で治療効果が示された候補薬剤が、臨床試験では有効性を示すには至っておらず、根本的治療法の開発は難航している。神経変性疾患に対するトランスレーショナルリサーチが成功しない主要因として、疾患の進行度や薬剤の有効性を反映するバイオマーカーが確立されていないこと、動物モデルと患者における分子病態の差異などが挙げられている。これらを克服し、神経変性疾患に対する治療法開発を進めるには、患者の生体内で生じている生物学的変化を反映するバイオマーカーの確立が必要不可欠であり、そのためには患者から得られる定量的臨床指標と生体試料の統合的解析を通じてヒトの病態にアプローチする必要がある。

### 2. 研究の目的

(1) 球脊髄性筋萎縮症（SBMA）の骨格筋におけるCl<sup>-</sup>チャネル発現低下に伴うNa<sup>+</sup>電流異常に着目し、モデルマウスに対してメキシチレン塩酸塩を投与することで運動解析や生存解析を行い、治療標的としての妥当性を検証する。

(2) 患者から得られる生体試料と臨床情報を統合して解析し、病態を反映するバイオマーカーを同定する。

### 3. 研究の方法

(1) 研究代表者らの予備的研究において、寒冷麻痺およびミオトニアの原因として報告されているNa<sup>+</sup>チャネルおよびCl<sup>-</sup>チャネルの発現をRT-PCRおよびウエスタンブロットで解析した結果、SBMA患者の骨格筋ではCl<sup>-</sup>チャネルのmRNAおよび蛋白質の両者が低下していることが明らかとなっている。また、患者における変化が疾患および病態特異的であることを明らかにするために行ったSBMAモデルマウスによる検討でも同様の知見を得た。Cl<sup>-</sup>チャネルの発現・機能低下によりNa<sup>+</sup>電流異常が生じることが知られているため、Na<sup>+</sup>チャネルブロッカーの投与により骨格筋細胞膜の過興奮性が低下し、運動症状を改善できる可能性があると考え、球脊髄性筋萎縮症患者に対するメキシチレン塩酸塩のプラセボ対照ランダム化比較試験（特定臨床研究）を実施し、その結果、実薬（メキシチレン）群においてADLスケールや運動機能の改善が認められた。本研究では、マウスモデルにメキシチレン塩酸塩を投与して運動解析や生存解析を行うことでSBMAの骨格筋変性に対するNa<sup>+</sup>電流異常の関与やSBMAに対する同薬の効果を裏付ける。

(2) SBMAでは病勢や薬効を鋭敏に反映するバイオマーカーが未確立である。これらのことは、病態や治療を考える上で、どの分子を標的にすればよいのかが不明であることを意味し、これが研究成果の臨床応用を妨げる重要な要因となっている。そこで、SBMA患者において運動機能検査〔握力、ピンチ力、10秒テスト、舌圧、Timed Walk Test、mQMG Score〕、運動機能指標の評価〔日本版ALSFRS-R、SBMAFRS〕、全身筋量評価（DXA法におけるlean mass）および血液検査などを行い、尿中Titinとの相関を解析する。Titinは、横紋筋特異的に発現する蛋白質であり、骨格筋障害に伴い断片化されて筋外に漏出することが知られており、様々な筋疾患の尿中で増加することが報告されている。研究代表者らの予備的検討では運動ニューロン疾患であるALSやSBMAでも尿中Titin値が上昇していることが示されており、尿中Titin値がSBMAの早期診断や臨床試験における評価項目としての新規のバイオマーカーとなり得ると考えられる。以上を踏まえて、本研究ではSBMA患者における尿中Titin値と臨床的重症度および予後との関連を解析することにより、SBMAの早期診断および病勢評価におけるバイオマーカーとしてTitinの有用性を確認するとともに、運動ニューロン疾患において切断され尿中レベルが上昇するメカニズムを解明することで、運動ニューロン疾患の骨格筋変性病態に迫る。さらに、本研究では、マウス坐骨神経切断モデルおよびSBMAモデルマウスの骨格筋組織を用いたN末titin断片のウエスタンブロットなどを実施することにより、運動ニューロン変性において、神経原性の筋障害によって尿中titinが上昇する分子メカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

特定臨床研究として実施した「SBMA患者におけるメキシチレン塩酸塩の有効性及び安全性を検討する多施設共同ランダム化二重盲検クロスオーバー比較試験」において、メキシチレン塩酸

評価項目	治療効果	
	差の推定値	P値
(投与開始から4週間後の変化量)		
<b>主要評価項目</b>		
尺骨神経遠位潜時の室温-寒冷時の差	-0.023	0.843
<b>副次評価項目</b>		
ALSFRS-R (全般的運動機能)	0.51	0.094
舌圧, kPa (嚥下機能)	1.33	0.023
10秒テスト, 回 (上肢運動機能)	1.37	0.037
握力, kg (上肢運動機能)	0.25	0.331
Timed walk test, 秒 (下肢運動機能)	-0.17	0.464
患者報告アウトカム (PRO), 疼痛	-0.53	0.035

表1 SBMA患者に対するメキシレチン塩酸塩投与試験

塩群において全般的な運動機能のみならず、嚥下や四肢の運動機能も改善傾向であったことなどから (表 1)、SBMA のモデルマウスにメキシレチン塩酸塩を経口投与あるいは腹腔内投与して運動解析や生存解析を行った結果、メキシレチン塩酸塩投与群において握力の改善や生存期間の延長を認めた (図 1)。これは、SBMA 患者における変化が疾患および病態特異的であることを示唆している。

**握力改善**

**生存期間を延長**

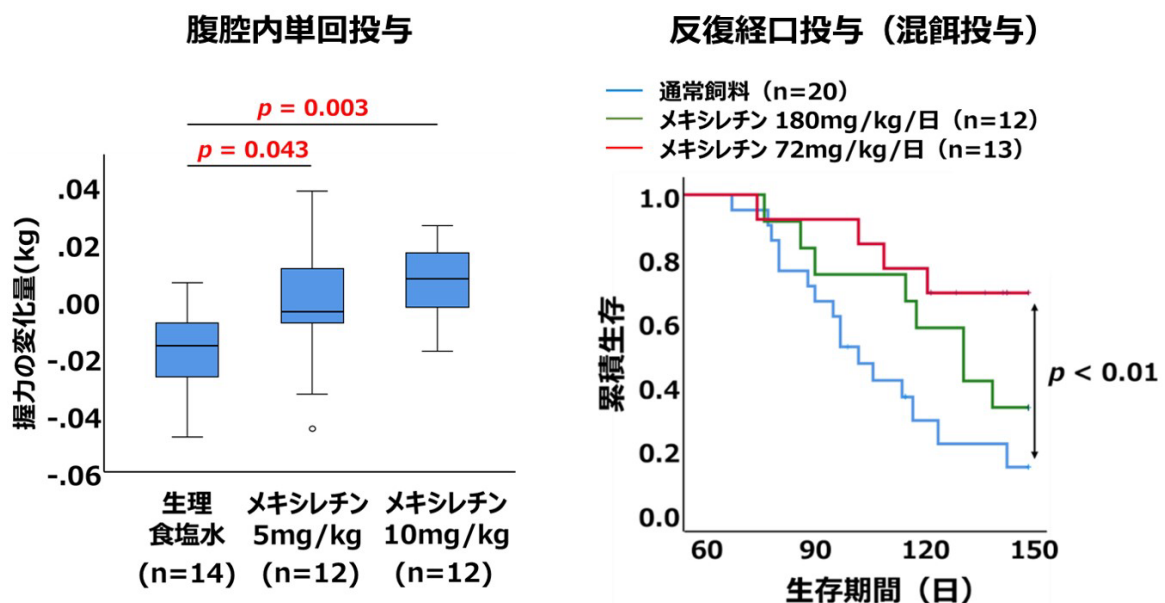


図1 SBMAモデルマウスに対するメキシレチン塩酸塩投与

また、横紋筋特異的に発現する蛋白質である Titin は、骨格筋障害に伴い断片化されて筋外に漏出することが知られている。SBMA 患者、ALS 患者、ニューロパチー患者および健常者の尿中 Titin N-fragment を測定したところ、SBMA 患者や ALS 患者は健常者と比較して尿中 Titin N-fragment が有意に高く (図 2)、ALS 患者では ALSFRS-R と相関していた。また、Cox 比例ハザードモデルにより尿中 Titin N-fragment は ALS 患者の生存予測因子であり、予測因子の多変量解析では尿中 Titin N-fragment と血清 NfL が独立した予測因子であることが示された。さらに、SBMA と ALS はしばしば鑑別を要することがあるが、尿中 Titin N-fragment は、高い確率で両者を弁別することが可能であった (図 3)。運動ニューロン変性によって、神経原性の筋障害によって尿中 titin が上昇する分子メカニズムを明らかにするため、マウス坐骨神経切断モデルを用いて筋肉における N 末 titin 断片の蛋白質レベルを解析した結果、マウス坐骨神経切断モデル群ではシャム群に比して有意に上昇していた (図 4)。このことから、尿中 Titin N-fragment

は筋損傷のみでなく運動ニューロンの脱神経も反映する可能性が示唆され、SBMA における筋肉の損傷を非侵襲的に測定することができ、疾患の早期診断や臨床試験における評価項目としての新規のバイオマーカーとなり得る可能性がある。

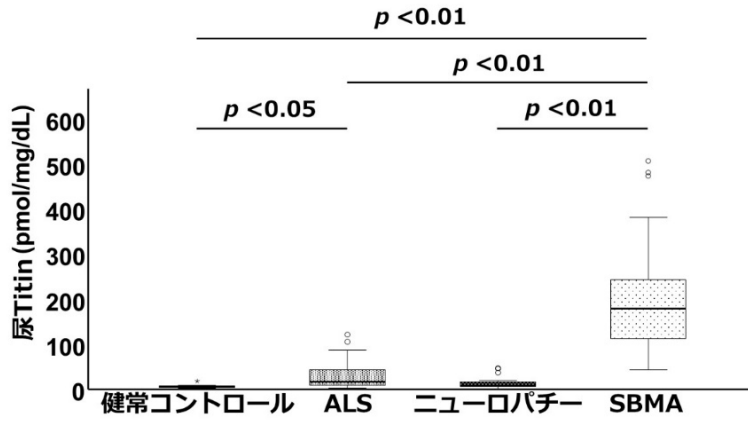


図2 SBMA患者における尿Titin (N末fragment)

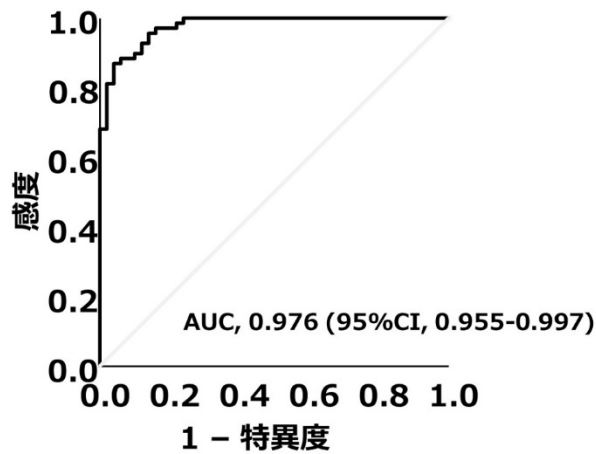


図3 尿中TitinによるALSとSBMAの弁別能

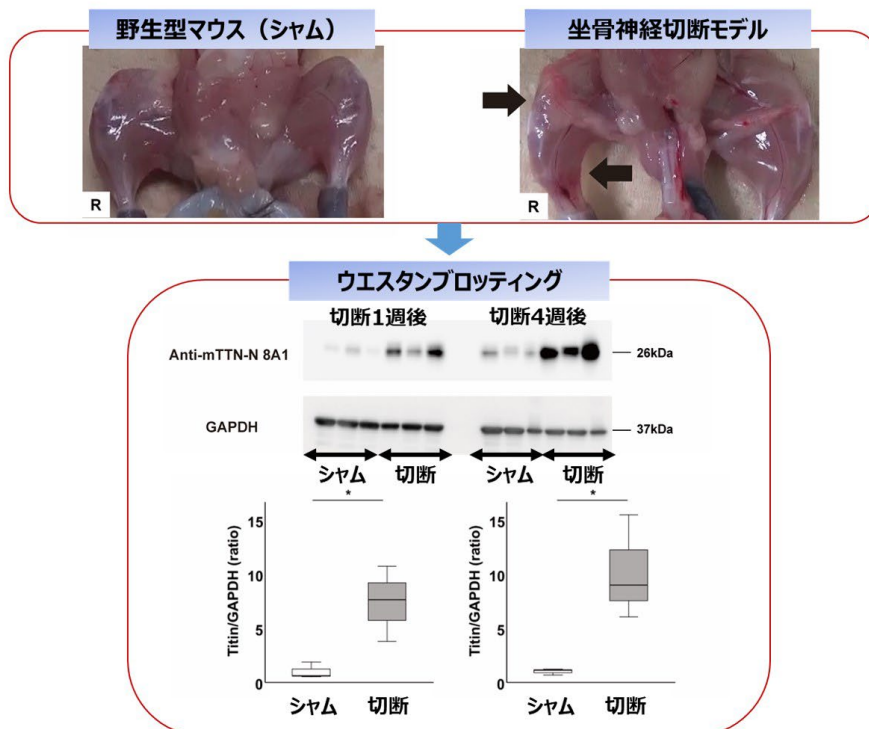


図4 神経原性筋障害におけるTitin-N fragment

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 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Shinichiro, Hashizume Atsushi, Hijikata Yasuhiro, Ito Daisuke, Kishimoto Yoshiyuki, Iida Madoka, Koike Haruki, Hirakawa Akihiro, Katsuno Masahisa	4. 巻 92
2. 論文標題 Ratio of urinary N-terminal titin fragment to urinary creatinine is a novel biomarker for amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1072 ~ 1079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jnnp-2020-324615	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 Yamada Shinichiro, Hashizume Atsushi, Hijikata Yasuhiro, Inagaki Tomonori, Ito Daisuke, Kishimoto Yoshiyuki, Kinoshita Fumie, Hirakawa Akihiro, Shimizu Shinobu, Nakamura Tomohiko, Katsuno Masahisa	4. 巻 9
2. 論文標題 Mexiletine in spinal and bulbar muscular atrophy: a randomized controlled trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Clinical and Translational Neurology	6. 最初と最後の頁 1702 ~ 1714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/acn3.51667	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5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinichiro Yamada, Atsushi Hashizume, Daisuke Ito, Yoshiyuki Kishimoto, Ryota Torii, Madoka Iida, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Urinary N-terminal titin fragment is a novel biomarker for amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田晋一郎, 橋詰 淳, 伊藤大輔, 岸本祥之, 鳥居良太, 飯田 円, 勝野雅央
2. 発表標題 Titinを標的とした筋萎縮性側索硬化症患者のバイオマーカー開発
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shinichiro Yamada, Atsushi Hashizume, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Development of symptomatic therapy in spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 KDA/KD-UK Conference OnLine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田晋一郎, 橋詰 淳, 勝野 雅央
2. 発表標題 臨床研究法と特定臨床研究
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinichiro Yamada, Atsushi Hashizume, Daisuke Ito, Yoshiyuki Kishimoto, Ryota Torii, Fumie Kinoshita, Shinobu Shimizu, Akihiro Hirakawa, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Efficacy and safety of mexiletine hydrochloride in spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------