

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月17日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659309

研究課題名 筋萎縮性側索硬化症の診断バイオマーカー探索の試み

研究課題名 An attempt to elucidate a biomarker for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis

研究代表者 小野 真一 (ONO SHINICHI)

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：20246862

研究成果の概要（和文）：ヒト変異 SOD1 (G93A、G127TGGG(G127X)、G85R、D90A) を有する transgenic(Tg)マウスではいずれも脊髄銅濃度は対照よりも有意に高かった。G93A と D90A は SOD1 活性部位において銅親和性が高く、G127X と G85R は親和性が低い。すなわち SOD1 活性に関与しない余剰な銅の存在が示唆された。銅取り込みに関与する Steap2、Ctrl、Cox17、Atox1 はいずれの Tg マウス脊髄でも有意に増加、銅排泄に関与する Atp7a は有意に低下していた。G93A マウスでは脊髄銅濃度は週齢依存的に上昇していた。変異 SOD1 を有する ALS では銅イオンが疾病のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using the mouse strains G127TGGG (G127X), G85R, D90A, and G93A, which express *SOD1* mutants with different copper-binding abilities, we showed that copper dyshomeostasis is common to these *SOD1* mutants. Copper contents bound to the SOD1 active site varied considerably between *SOD1* mutants: G93A and D90A *SOD1* mutants have higher affinity to copper ions at their active site, whereas the affinity to copper ions are lower in G127X and G85R *SOD1* mutants. Irrespective of the affinity, all the *SOD1* mutants upregulated Steap2, Ctrl, Cox17, and Atox1, and downregulated Atp7a, which resulted in copper accumulation in spinal cords of the mice. We propose that copper dyshomeostasis is common to *SOD1* mutation-linked ALS, and could be useful as a biological marker for the diagnosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	900,000	270,000	1,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：銅イオン、Ammonium tetrathiomolybdate、変異 SOD1、銅イオンキレート

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は進行性四肢麻痺、球麻痺・呼吸筋麻痺を来し、発症後 4～5 年で死に至る神経変性疾患である。1869 年 Charcot による報告から 140 年以上が経過した現在でも治療法は見い出されていない。唯一、抗グルタミン酸薬 riluzole

が認可されているが、生存期間はおろか、麻痺の進行も抑制できない。進行を続ける医学の中で取り残された領域である。さらに ALS に代表される神経変性疾患の診断は、今なお臨床診断を主体としている。治療法を見出すことはもちろん、早期発見・早期治療のみならず疾患の客観的指標としても

バイオマーカーは必須である。ALS のうち *Superoxide dismutase 1 (SOD1)* 変異を有する ALS についてはその原因として、*SOD1* 変異による *SOD1* 活性の低下ではなく変異 *SOD1* が新たに獲得した未知の細胞毒性が原因と考えられている。

このような状況の中、研究代表者は家族性 ALS モデルマウス (G93A *SOD1*) を用い、運動麻痺出現以前の発症早期から責任病巣の 1 つである脊髄で、銅濃度と銅結合たんぱく質であるメタロチオネイン (metallothionein, MT) の週齢依存的な増加を見出した。MT は生体内で銅、亜鉛といった微量元素の恒常性、重金属の解毒、抗酸化作用を担っている。この知見に基づき、細胞内選択的銅キレート剤の Ammoniumtetrathiomolybdate (ATTM) 投与と MT 投与のいずれもが ALS モデルマウスに奏効 (生存期間が 24% 延長) することをみ出した。これは少なくとも G93A *SOD1* 変異を有する ALS モデルマウスでは、細胞内への銅取り込み機構は亢進、排泄機構が低下していることを示唆する所見である。細胞内に限局した銅イオン増加が生じ、銅結合たんぱく質 MT が防御的・反応的に増加すると考えれば、MT ならびに ATTM がこの状態を改善したことが生存期間の延長につながったと考えられた。さらに変異 *SOD1* は細胞内の銅代謝に係るたん白質群 (銅シャペロン) と凝集体を形成していた (*J Neurochem* 2009 111:181-191)。以上から、我々は、変異 *SOD1* が獲得した未知の細胞毒性の本態は細胞内銅代謝障害ではないかと考えるにいたったのである。

そこで G93A *SOD1* 変異以外の ALS モデルマウスを用いて、銅イオンのバイオマーカーとしての有用性を検討した。ALS と銅に関する纏まった研究はこれまでほとんど成されてこなかった。古くは Gellein らがヒト大脳皮質運動領野で銅濃度の上昇を報告している (*Biol Trace Elem Res* 2003 96:39-60)。また Domzal らはヒト末梢血で銅濃度の低下を報告している (*Neurol Neurochir Pol* 281:343-346)。これらの知見を鑑みれば、少なくとも *SOD1* 変異に起因する ALS の背景には銅代謝の異常が存在することが覗かれる。しかし、ALS と銅をはじめとする微量元素の関連についての研究はここ数十年ほとんど顧みられていないのが現実である。

本研究では、上述した Gellein らと Domzal らの知見に我々の知見を加味し、我々が提唱している細胞内銅代謝異常の存在を *SOD1* 変異を有する ALS 診断のバイオマーカーとして利用できないか、検討したものである。

## 2. 研究の目的

研究の背景に述べたように、我々は、*SOD1* 変異を有する ALS の背景に「細胞内銅代謝の障害」の存在という新たな病態概念を提唱した。すなわち、銅ならびに細胞内銅代謝にかかわるシャペロンが変異 *SOD1* を有する ALS の診断ならびに病態を客観的に把握するバイオマーカーとして有用ではないかと考えに至ったのである。

*SOD1* 変異は数多く知られているのでそのすべてについて銅代謝との関連を検証することは現実的ではないし、不可能である。そこで、代表的な 4 種類のヒト変異 *SOD1* (G93A, G127TGGG (G127X), G85R, D90A) を有するトランスジェニックマウス (Tg) を用い、野生型 *SOD1* マウス (WT) (変異 *SOD1* の対照) と C57BL/6 マウス (変異および WT *SOD1* の過剰発現に対する対照) を対照として、これらマウスにおいて責任病巣の 1 つである脊髄で、銅イオン濃度、細胞内に銅を取り込む前段階で銅イオンを還元する Steap2 (Six trans-epithelial antigen of prostate)、細胞内に取り込む Ctrl1 (Copper transporter)、細胞内銅シャペロンの 1 つである Cox17 (cytochrome c oxidase copper chaperone)、Atox1 (Antioxidant)、細胞内からの銅排泄にかかわる Atp7a の週齢依存的な変化の有無について検討した。

## 3. 研究の方法

4 種類のヒト変異 *SOD1* (G93A, G127X, G85R, D90A) を有するトランスジェニックマウス (Tg) を用いた。対照には野生型 *SOD1* マウス (WT) (変異 *SOD1* の対照) と C57BL/6 マウス (変異および WT *SOD1* の過剰発現に対する対照) を用いた。各群 3 匹ずつを用いた。この動物実験は、本学動物実験委員会の承認を得て行った。

脊髄において、ICP-MS (Inductively coupled plasma mass-spectrometry) 法により銅濃度を週齢ごとの変化を検討した。同じく脊髄において、細胞内への銅取り込みに関与する Steap2)、Ctrl1 (Copper transporter)、細胞内銅シャペロンの Cox17 (Cytochrome C oxidase copper chaperone)、Atox1 (Antioxidant)、細胞内からの銅排泄に関与する Atp7a のたん白質発現量をウエスタンブロット法で検討した。

また、研究の背景の項で記した、中枢神経移行性に優れ、細胞外のみならず細胞内の銅も除去できる選択的銅キレート剤である ammonium tetrathiomolybdate (ATTM) を G93A マウスを対象として、ALS 症状発症後から 5 mg/kg/日 で腹腔内投与し、その効果を検証した。ALS に代表される神経変性疾患の治療の実際は、早期診断・早期治療に有用なバイオマーカーがない現状を鑑み

れば、診断確定後に治療が開始されるのが現実だからである。

#### 4. 研究成果

Steap2, Ctr1, Cox17, Atox1 は 4 種類のヒト変異 SOD1 (G93A, G127TGGG (G127X)、G85R, D90A) を有する Tg マウス脊髄で有意に増加、Atp7a は有意に低下していた。そして脊髄銅濃度も、週齢依存的に上昇していた。細胞内銅代謝異常は SOD1 変異に共通する細胞毒性であることが強く示唆される。これは、SOD1 変異を有する ALS では、細胞内銅代謝異常が存在することを強く示唆するものであり、銅ならびにその輸送体タンパク質である Steap2, Ctr1, Atox1, Cox17, Atp7a は診断に有用なバイオマーカーとなることを示唆する知見である。

また、中枢神経移行性に優れ、細胞外のみならず細胞内の銅も除去できる選択的銅キレート剤である ammonium tetrathiomolybdate (ATTM) を G93A マウスを対象として ALS 症状発生後から 5 mg/kg/日 で腹腔内投与をしたところ、脊髄銅濃度は対照 (B6SJL マウス) と同レベルに低下し、生存期間は対照薬 (PBS) 投与に比し 11% 延長 (平均 120 日 vs 134 日)、罹病期間は 40% 延長した (平均 27 日 vs 39 日)。脊髄前角の神経細胞と軸索の減少を有意に抑制し、筋線維の減少も有意に軽減させた。さらに脊髄前角でヒト変異 SOD1 の凝集を抑制し、これは不溶性画分を有意に減少させた結果であることが *in vitro* での検討から明らかとなった。これらの知見は、ヒト変異 SOD1 の凝集には細胞内への過剰な銅の蓄積が関与する可能性を強く示唆するものである。銅は元来必須微量元素であるが、過剰に存在すればアポトーシスや酸化ストレスを惹起することで細胞毒性を発揮する。治療効果の点からも、細胞内銅代謝異常が変異 SOD1 を有する ALS の病態に強くかかわることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ono S, Sone R, Tokuda E. A possible novel pharmacological therapy for Parkinson disease using the pleiotropic property of selegiline. *Journal of Alzheimer's disease and Parkinsonism*. 2013, *in press*
2. Suzuki Y, Oishi M, Kanno A, Ogawa K, Fujiwara M, Kamei S. Amyotrophic lateral sclerosis accompanying elevated

catecholamines occurring as a complication of takotsubo cardiomyopathy. *Geriatrics and Gerontology International*, 2013, 13: 240-241.

3. Ogawa K, Suzuki Y, Oishi M, Kamei S, Shigihara S, Nomura Y. Clinical study of medial area infarction in the region of posterior inferior cerebellar artery. *Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases*, 2013, 22: 508-513.

4. Suzuki Y, Takasu T, Tsukamoto S. Ethanol Consumption Increases Methanol. *International Medical Journal*. 2013, 20: 285-287.

5. Tokuda E, Okawa E, Watanabe S, Ono S, Marklund S : Dysregulation of intracellular copper homeostasis is common to transgenic mice expressing human mutant superoxide dismutase-1s regardless of their copper-binding abilities. *Neurobiology of Disease*, 2013 54: 308-319.

6. Suzuki Y, Oishi M, Ogawa K, Kamei S: A case of Marchiafava-Bignami disease complicating diabetes mellitus treated effectively with steroid. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2012, 19: 761-762.

7. Oshima H, Katayama Y, Morishita T, Sumi K, Otaka T, Kobayashi K, Suzuki Y, Fukaya C, Yamamoto T: Subthalamic nucleus stimulation for attenuation of pain related to Parkinson disease. *Journal of Neurosurgery*, 2012, 116: 99-106.

8. Suzuki Y, Kanno A, Minami M, Ogawa K, Oishi M, kamei S: Case of acute cerebellitis as a result of varicella zoster virus infection without skin manifestations. *Geriatrics and Gerontology International*, 2012, 12: 756-757.

9. Suzuki Y, Oishi M, Kanno A, Ogawa K, Kamei S: Case of beriberi showing improved cerebral blood flow after thiamine treatment. *Geriatrics and Gerontology International*, 2012, 12: 757-759.

10. Kanno A, Suzuki Y, Minami M, Ogawa K,

Oishi M, Kamei S. A healthy, 81-year-old female with toxoplasmic encephalitis. *Geriatrics and Gerontology International*, 2012, 12: 759-761.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Tokuda E, Okawa E, Watanabe S, Ono S, Marklund SL : Dysregulation of intracellular copper homeostasis is common for dismutase active and inactive form of SOD1 mutants. The 22<sup>nd</sup> International Conference on ALS/MND, Sydney, Australia, 2011.12.1

2. Tokuda E, Ono S, Marklund SL: Dysregulation of intracellular copper trafficking in common for active and inactive form of SOD1 mutants. 9th Meeting of the European Network for the Cure of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Hannover, Germany, 2011.5.13-15

〔図書〕（計 1 件）

Ono S, Tokuda E, Okawa E, Watanabe S: An attempt to treat amyotrophic lateral sclerosis by intracellular copper modification using ammonium tetrathiomolybdate and/or metallothionein. Fundamentals and perspective. *In* Brown DR, ed. *Brain Diseases and Metalloproteins*. Pan Stanford Publishing, Singapore, 2012, pp. 367-405.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 1 件）

名称：筋萎縮性側索硬化症治療薬  
発明者：小野真一、徳田栄一  
権利者：学校法人日本大学  
種類：特許  
番号：5099620  
取得年月日：2012 年 10 月 5 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野真一 (ONO SHINICHI)  
日本大学・薬学部・教授  
研究者番号：20246862

(2) 研究分担者

鈴木裕 (SUZUKI UTAKA)  
日本大学・医学部・准教授  
研究者番号：10287625