

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659458

研究課題名(和文) 抗TNF製剤を用いたALS治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic approach for ALS using anti-TNF antibody

研究代表者

梶 龍児 (KAJI, Ryuji)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00214304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスであるヒトSOD1-G93Aトランスジェニックマウスにマウス抗TNF alpha抗体を投与し、病気進行にどのような影響があるかを調べた。生存日数、体重、運動能力においては、投与群、非投与群において有意差が認められなかった。しかし、残存している脊髄運動ニューロン数やグリオシスなどの病理所見において、病勢を抑えると思われる効果が認められた。TNF-alphaが神経変性の一過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

NF kappa, JNK-AP-1, caspase 3などの下流の生化学的反応がどの程度抑制されたのかを調べる必要があると考えた。

研究成果の概要(英文)：Mouse anti-TNF alpha antibody was intraperitoneally administered to SOD1 mice, which are widely used for animal model for amyotrophic lateral sclerosis. We physiologically and pathologically evaluated the efficacy of the therapy or suppression of disease progression. No significant result was obtained in physiological evaluations, including life span, body weight and motor functions. However, pathological examination revealed partial ameliorative response, including the numbers of survival motor neurons and the reactive gliosis. These results further supported involvement of neuroinflammation in motor neuron death by mutant SOD1 probably at the end stage. Evaluation of the downstream cascades, such as NF kappa, JNK-AP-1 and caspase 3, is necessary to optimize the therapy using the anti-TNF alpha antibody.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：TNF ALS SOD1

1. 研究開始当初の背景

我々は徳島県及びその近隣の地域にみられた極めて珍しい常染色体劣性遺伝の ALS 数家系から homozygote mapping 法を用いて新規原因遺伝子 *OPTN* を発見した (Maruyama H., Kaji R, Kawakami H. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010 13;465:223-6)。 *OPTN* は家族性緑内障の原因遺伝子とされてきたが、今回 ALS でみられた変異はすべて ubiquitin-binding domain 近傍にみられ、緑内障例とは異なる。Optineurin は元来 TNF /NFkB 系をフィードバック機構で抑制する機能を持つが、ALS と関連した *OPTN* 変異ではこの抑制能を欠いており TNF /NFkB 系の異常な賦活化が細胞死に関係していると考えられた。このヘテロ接合体異常例 (heterozygous E478G missense mutation) の剖検所見では、抗 Optineurin 抗体で染まる封入体が脊髄運動ニューロンでみられた。また同様の Optineurin 陽性の封入体は、SOD1 遺伝子変異を伴う ALS や孤発性 ALS でも見られたことから、異常な TNF /NFkB 系の賦活化による細胞死は ALS 全体や、他の神経変性疾患でも final common path となっている可能性がある。また、TNF 抑制作用をもつ thalidomide が SOD1 変異を伴う transgenic mouse において延命効果がる事が知られており、我々自身の上記の研究成果から、すでに慢性関節リュウマチの治療薬として上市されている可溶性 TNF 受容体制剤や抗 TNF モノクローナル抗体製剤が ALS など神経変性疾患に有効である可能性があるとの着想に至った。

2. 研究の目的

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は原因不明で根治的治療法のない神経難病である。我々は、伴性劣性遺伝形式をとる ALS 家系から新規

原因遺伝子 *OPTN* (Optineurin) を発見し、それと関連した TNF /NFkB 系の異常な賦活化が、遺伝性のみならず大半をしめる孤発性 ALS においても関与している可能性があることを報告した (Maruyama et al. *Nature* 2010)。本研究では慢性関節リュウマチに対してすでに用いられている抗 TNF モノクローナル抗体製剤または TNF 受容体制剤を用いた画期的な新規治療薬を開発するため、ALS のモデルである G93A SOD1 transgenic mouse においてこれらの薬剤がその生存期間に及ぼす影響を検討することを目的とする。もしこれらで治療効果が得られれば上記の製剤はすでに上市されていることからヒトでの臨床研究を加速できる。

3. 研究の方法

マウスを飼育し G93A hemizygotes をもつ動物を B6SJLF1/J hybrid 雌マウスと交配させることによって維持する。マウスの尾部から DNA を採取して PCR 法で遺伝子を確認する。このようにしてできる子孫の G93A transgenic マウスをコントロール (生食), エタネルセプト投与群 (可溶性 TNF /LT レセプター製剤 1 mg/kg /week 群と 2mg/kg/week 群), アダリムマブ (抗 TNF モノクローナル抗体製剤 1 mg/kg/2week 群と 2 mg/kg/2week 群) 投与群として腹腔内注射する群にわけるとして。各群 20 匹を確保し計 100 匹で生存曲線を primary end point として Kaplan-Myer plot で比較する。また、臨床的観察で感染症などの有害事象が疑われる場合、1 - 2 匹を剖検してその病理所見や重症度を検討する。

- ・ Rotarod による運動機能の評価
- ・ Rotarod による運動機能評価を週 2 回、70 日齢から開始して各群間で比較する。
- ・ Optineurin 陽性封入体の定量 前年度の実験で生存している 100 日齢の各群 3-5

匹のマウスの剖検を行い保存した標本から、神経病理学的に残存している脊髄運動ニューロン数の定量・比較や抗 OPTN 抗体を用いた免疫組織化学的な検討を行う。結果を分析し、ヒトでの臨床研究への橋渡しについて検討する。特許申請・論文化を図る。

4 . 研究成果

筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスであるヒト SOD1-G93A トランスジェニックマウスにマウス抗 TNF alpha 抗体を投与し、病気進行にどのような影響があるかを調べた。生存日数、体重、運動能力においては、投与群、非投与群において有意差が認められなかった。しかし、残存している脊髄運動ニューロン数やグリオーシスなどの病理所見において、病勢を抑えると思われる効果が認められた。TNF-alpha が神経変性の一過程において重要な役割を果たしていることが示唆された。

NF kappa, JNK-AP-1, caspase 3 などの下流の生化学的反応がどの程度抑制されたのかを調べる必要があると考えた。

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8件)

著者名:Hiroyuki Ishiura, Wataru Sako, Mari Yoshida, Toshitaka Kawarai, Osamu Tanabe, Jun Goto, Yuji Takahashi, Hidetoshi Date, Jun Mitsui, Budrul Ahsan, Yaeko Ichikawa, Atsushi Iwata, Hiide Yoshino, Yuishin Izumi, Koji Fujita, Kouji Maeda, Satoshi Goto, Hidetaka Koizumi, Ryoma Morigaki, Masako Ikemura, Naoko Yamauchi, Shigeo Murayama, Garth A.

Nicholson, Hidefumi Ito, Gen Sobue, Masanori Nakagawa, Ryuji Kaji and Shoji Tsuji

論文標題 : The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement (HMSN-P).

雑誌名 : Am J Hum Genet

査読の有無 : 有

巻 : 91

発行年 : 2012

最初と最後の頁 : 320-329

DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.07.014

著者名 : Kaji R, Izumi Y, Adachi Y, Kuzuhara S.

論文標題 : ALS-parkinsonism-dementia complex of Kii and other related diseases in Japan.

雑誌名 : Parkinsonism & related disorders

査読の有無 : 有

巻 : 18 Suppl 1

年 : 2012

最初と最後の頁 : S190-191.

DOI: 10.1016/S1353-8020(11)70059-1

著者名 : Ogaki K, Li Y, Atsuta N, Tomiyama H, Funayama M, Watanabe H, Nakamura R, Yoshino H, Yato S, Tamura A, Naito Y, Taniguchi A, Fujita K, Izumi Y, Kaji R, Hattori N, Sobue G.

論文標題 : Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis.

雑誌名 : Analysis of C9orf72 repeat expansion in 563 Japanese patients with amyotrophic lateral sclerosis.

査読の有無 : 有

巻 : 33

年 : 2012

最初と最後の頁 : 2527 e2511-2526

DOI:

10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.011

著者名 : Sako W, Ito H, Yoshida M, Koizumi H, Kamada M, Fujita K, Hashizume Y, Izumi Y, Kaji R.

論文標題 : Nuclear factor kappa B expression in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis and hereditary amyotrophic lateral sclerosis with optineurin mutations.

雑誌名 : Clinical neuropathology

査読の有無 : 有

巻 : 31

年 : 2012

最初と最後の頁 : 418-423

DOI: 10.5414/NP300493

著者名 : shiura H, Sako W, Yoshida M, Kawarai T, Tanabe O, Goto J, Takahashi Y, Date H, Mitsui J, Ahsan B, Ichikawa Y, Iwata A, Yoshino H, Izumi Y, Fujita K, Maeda K, Goto S, Koizumi H, Morigaki R, Ikemura M, Yamauchi N, Murayama S, Nicholson GA, Ito H, Sobue G, Nakagawa M, Kaji R, Tsuji S.

論文標題 : The TRK-fused gene is mutated in hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominant involvement.

雑誌名 : American journal of human genetics

査読の有無 : 有

巻 : 91

年 : 2012

最初と最後の頁 : 320-329

DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.07.014

著者名 : Fujita K, Yoshida M, Sako W,

Maeda K, Hashizume Y, Goto S, Sobue G, Izumi Y, Kaji R.

論文標題 : Brainstem and spinal cord motor neuron involvement with optineurin inclusions in proximal-dominant hereditary motor and sensory neuropathy.

雑誌名 : J Neurol Neurosurg Psychiatry

査読の有無 : 有

巻 : 83

年 : 2011

最初と最後の頁 : 1402-3

DOI: 10.1136/jnnp-2011-300783

著者名 : Okita T1, Nodera H, Shibuta Y, Nodera A, Asanuma K, Shimatani Y, Sato K, Izumi Y, Kaji R.

論文標題 : Can Awaji ALS criteria provide earlier diagnosis than the revised El Escorial criteria?

雑誌名 : J Neurol Sci

査読の有無 : 有

巻 : 302

年 : 2011

最初と最後の頁 : 29-32

DOI: 10.1016/j.jns.2010.12.007

著者名 : Kaji R, Izumi Y, Adachi Y, Kuzuhara S

論文標題 : ALS-parkinsonism-dementia complex of Kii and other related diseases in Japan

雑誌名 : Parkinsonism Relat Disord

査読の有無 : 有

巻 : 18 Suppl

発行年 : 2011

最初と最後の頁 : 190-1

DOI: 10.1016/S1353-8020(11)70059-1

[学会発表](計2件)

発表者：梶 龍兒、森田光哉、瓦井俊孝、
森垣龍馬、藤田浩司、野寺裕之、和泉唯信、
後藤 惠、中野今治
発表演題：TFG 変異による運動ニューロン
死のメカニズム
学会等名：第 54 回日本神経学会学術大会
2013
発表年月日：2013 年 5 月 31 日
発表場所：東京国際フォーラム（東京都）

発表者：Kaji R
発表演題：Electrophysiological
diagnosis of ALS
学会等名：World Congress of Neurology
発表年月日：2011.11.13.
発表場所：Mansour Eddhabi Congress
Center (Marrakesh Morocco)

〔図書〕(計2件)

著者名：瓦井俊孝、森垣龍馬、藤田浩司、
和泉唯信、梶 龍兒
出版社：科学評論社
書名：神経内科
発行年：2013 年
総ページ数：766(751-756)

著者名：藤田浩司、瓦井俊孝、和泉唯信、
後藤 惠、梶 龍兒
出版社：科学評論社
書名：神経内科
発行年：2013 年
総ページ数：766(732-737)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)
名称：THE METHOD OF TREATING
AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS
発明者：梶 龍兒
権利者：徳島大学

種類：特許
番号：PCT-JP2012-056217
出願年月日：2012.3.6
国内外の別：外国

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

梶 龍兒 (KAJI, Ryuji)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授
研究者番号：00214304

(2)研究分担者

後藤 惠 (GOTO, Satoshi)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・特任教授
研究者番号：50240916

(3)連携研究者

瓦井 俊孝 (KAWARAI, Toshi taka)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・講師
研究者番号：50614137