

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 8月27日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23790986

研究課題名（和文）

球脊髄性筋萎縮症の治療反応性を規定するバイオマーカーの探索

研究課題名（英文）

Biomarkers predicting therapeutic effects in patients with spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)

研究代表者

坂野 晴彦 (BANNO HARUHIKO)

名古屋大学・高等研究院（医）・特任講師

研究者番号：40594057

研究成果の概要（和文）：球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は遺伝性の神経変性疾患であり、全身の筋力低下を主症状とする。根本的治療は存在せず、現在治療法開発が進められている。SBMAは緩徐進行性のため長期間の臨床試験が必要であることが問題になっており、治療効果を予測するバイオマーカー（生物学的指標）の開発が重要である。本研究ではバイオマーカーとなりうる蛋白について患者尿、血液を用いて検索した。

研究成果の概要（英文）：SBMA, also known as Kennedy's disease, is an adult-onset, hereditary motor neuron disease characterized by muscle atrophy, weakness and bulbar involvement. Given that SBMA is a slowly progressive disease, extremely long-term clinical trials are likely necessary to verify clinical benefits of disease-modifying therapies. Suitable surrogate endpoints, which reflect the pathogenesis and severity of SBMA, are thus substantial to assess the therapeutic efficacy in drug trials. To this end, appropriate biomarkers should be identified and validated in translational researches. In this research, we analyzed patients' serum and urine using proteomics approach.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学 神経内科学

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：神経変性疾患、球脊髄性筋萎縮症、運動ニューロン疾患、臨床試験、バイオマーカー、プロテオーム解析、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症（SBMA）は遺伝性の神経変性疾患であり、四肢や咽頭筋の筋萎縮・筋力低下を主症状とする。根本的治療は存在せず、球麻痺による呼吸器感染が死因となることが多い。

本疾患の原因はアンドロゲン受容体遺伝子内の CAG 繰り返し配列の異常延長であり、ハンチントン病、脊髄小脳変性症と同じく、ポリグルタミン病と呼ばれる。SBMA の病態の根幹は、遺伝子異常により生じる変異ア

ンドロゲン受容体が、男性ホルモンの存在下で運動ニューロンの核内に集積することである。SBMA の病態に基づく治療法開発として、我々の研究室では男性ホルモン抑制剤であるリュープロレリン酢酸塩が変異アンドロゲン受容体の核内集積を阻害し、SBMA マウスの運動機能や病理所見を改善することを見いだした。また、我々はこれらの知見に基づいて 50 例の SBMA 患者を対象に第 II 相臨床試験を実施し、嚥下機能などに対する治療効果を明らかにした (Banno et al.,

Ann Neurol 2009)。さらに、第Ⅲ相試験（医師主導治験）を行い、リユープロレリン酢酸塩の効果を検討したところ、主要評価項目である嚥下造影所見に関し、罹病期間の短い患者群（罹病期間 10 年未満）において有意に改善することを明らかにした（ $P=0.009$ ）。また、本疾患の病態の根幹である変異アンドロゲン受容体の薬剤による集積低下を確認した（Katsuno, Banno, Suzuki et al., *Lancet Neurol* 2010）。

リユープロレリン酢酸塩による治療が、病態に基づく根本的治療法として確立したものとなり、標準的治療法として普及していくためには、今後も新たな臨床試験が必要と考えられる。しかし神経変性疾患に対する病態抑止療法の特徴として、疾患が緩徐進行性のため薬効が捉えにくいという問題点があり、長期間にわたり多数の被験者が必要となるという現状を打破し、治療に反応する患者群を早期に捉えることが重要である。

これまでの研究から、変異アンドロゲン受容体の核内集積を検出するための陰嚢皮膚生検所見は、薬効を鋭敏に反映するバイオマーカーとして有用であることが判明したが、治療を行うと全症例において明らかな変化を生じるため、治療反応群を検出する指標にはなりにくい。さらに生体内での変異アンドロゲン受容体を客観的に検出する分子イメージングの可能性について研究を重ねたが、神経細胞核内の分子検出は非常に困難であることが判明した。一方、我々は DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析において、SBMA の病態関連遺伝子として CGRP1 (Calcitonin gene-related peptide) を既に同定している。CGRP は 37 アミノ酸からなるニューロペプチドであり、バイオマーカーとして有用である可能性が高い。SBMA に対する病態抑止療法の確立に向けて、CGRP を含む新たな血漿バイオマーカーを網羅的に探索し、信頼できるバイオマーカーを同定し、その中からリユープロレリン酢酸塩による治療反応性を規定するバイオマーカーを見いだすことができれば、治療に反応する患者群の早期特定に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

現在、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症に代表される神経変性疾患に対する治療法開発の試みは世界中で精力的に行われているが、根本的な治療法として確立しているものは殆どない。

神経変性疾患の治療法開発が困難である理由の一つに、信頼できるバイオマーカーが確立されていないことが挙げられる。ポリグルタミン病の中でも SBMA は原因遺伝子が 1991 年に最も早く報告された疾患であり、原因遺伝子がアンドロゲン受容体内に存在

していることからハンチントン病などと比べ病態解明が進んでいる。SBMA は、病態機序に基づいた分子標的治療（病態抑止療法）の実現が特に期待される神経変性疾患の一つであるといえる。神経変性疾患の病態抑止療法を確立するためには、有効性を確実に把握するための臨床的指標とともに、病態を反映し信頼できるバイオマーカーを疾患毎に同定することが重要である。有用なバイオマーカーは薬効を早期に検出するための代用エンドポイント（surrogate endpoint）にもなり得る。本研究により、リユープロレリン酢酸塩の有効性に関連する新たな病態マーカーを同定することができれば、薬剤に反応する患者群を早期に抽出することに結びつき、SBMA の病態抑止療法確立への大きな推進力となる。また、このように疾患毎に有用なバイオマーカーを確立することは、緩徐進行性の神経変性疾患全てに共通したトランスレーショナルリサーチにおける重要な課題と考えられる。

本研究では病態抑止療法の確立を目指し、治療に反応する患者群を早期に捉えるために、SBMA の治療反応性を規定する血漿バイオマーカーを探索する。具体的には、①患者血漿を用いて SBMA の重症度に関与する分子をプロテオーム解析により同定する、②同定された分子からリユープロレリン酢酸塩による治療反応性に関与する分子を抽出する、③得られたバイオマーカーを用いて治療に反応する患者群を早期に捉えることで病態抑止療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、SBMA 血漿のプロテオーム解析を行い、重症度を反映して発現強度が変化する質量のピークを検索、目的のタンパク質のアミノ酸配列を決定し、データベースから重症度を反映する目的タンパク（バイオマーカー）を同定する。さらに同定された新規バイオマーカーの組織局在について、免疫染色を用いて確認する。またリユープロレリン酢酸塩を投与された SBMA 患者の臨床データと対比することにより、薬剤反応性に関連するバイオマーカーを新規バイオマーカー候補の中から抽出する。得られた新規バイオマーカーを用いることで薬剤に反応する被験者群を前もって同定することを目指す。

また SBMA 患者に対する第Ⅱ・Ⅲ相試験の結果、病態の根本と考えられている変異アンドロゲン受容体の集積がリユープロレリン酢酸塩によって低下することが確認された。さらに罹病期間の短い患者群で嚥下機能に有意な改善が認められた。本治療法が病態に基づく根本的な標準的治療法になるよう、新規医師主導治験を行い、患者血漿の使用に関わる体制整備を進め、同意が得られた

SBMA 患者を対象に血漿検体の縦断的データ収集を進める。

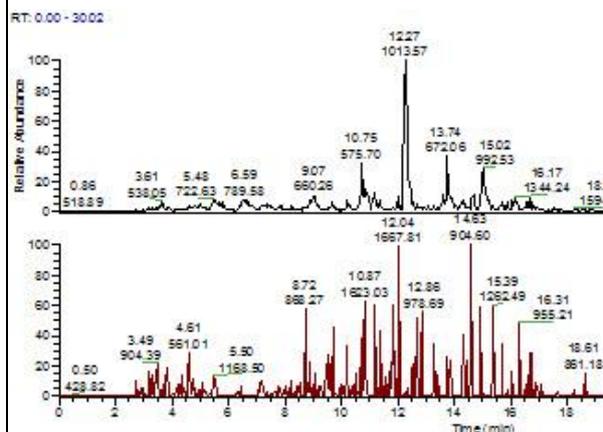
4. 研究成果

我々は平成 23 年度に新規医師主導治験を開始した。本研究では患者血漿・尿の使用に関わる体制整備を進め、治験のサブスタディとして同意が得られた SBMA 患者を対象に血清検体の収集を開始した。新規医師主導治験は名古屋大学を含む全国 5 施設（名古屋大学、自治医科大学、千葉大学、東京大学、東京医科歯科大学）で行われ、100 例強の被験者の登録を得ることができた。治験のサブスタディは名古屋大学単独で行い、患者血漿、尿の集積を進めるとともに、運動機能スケール、嚥下機能、舌圧等の評価項目を同時に計測し、今後のバイオマーカー探索が容易になるように施行した。

本研究に並行して我々のグループでは尿中の酸化ストレスマーカーである 8OHdG が、SBMA において重症度を反映するバイオマーカーである可能性について明らかにした (Mano et al. *Muscle and Nerve*, 2012)。また、SBMA34 例を 3 年間前向きにフォローした結果から、血中クレアチニン(Cr)が運動機能の重症度を反映するマーカーとして有用であることが判明した (Hashizume et al. *Brain*, 2012)。

さらに、我々は健常人および SBMA 血清検体を対象にプロテオーム解析を行った。血清検体を対象にした LC-MS/MS による解析はアルブミン・IgG 除去キットを用いて安定して行うことができるようになり。SBMA においては尿よりも血清、血漿の方が候補分子を同定しやすいことが判明した。しかし、膨大な蛋白分子の中からどの分子をバイオマーカーとして注目するかという点に問題点が残った。今後は疾患特異的で臨床的に意味のあるバイオマーカー候補をいかにして多数の候補の中から抽出するかが課題であり、将来的には集積が進められつつある約 60 例の SBMA 患者の臨床データを対象に検討をしていく予定である。

図 プロテオーム解析の結果例



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 9 件)

(1) Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Tanaka F, Sobue G. Cross-sectional and longitudinal analysis of an oxidative stress biomarker for spinal and bulbar muscular atrophy. *Muscle Nerve*. 2012;46:692-7. doi: 10.1002/mus.23413. 査読有

(2) Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Atsuta N, Oe H, Watanabe H, Tanaka F, Sobue G. Longitudinal changes of outcome measures in spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain*. 2012;135:2838-48. doi: 10.1093/brain/aws170. 査読有

(3) Tanaka F, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Adachi H, Sobue G. Current status of treatment of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neural Plast*. 2012;2012:369284. doi: 10.1155/2012/369284. 査読有

(4) Katsuno M, Tanaka F, Adachi H, Banno H, Suzuki K, Watanabe H, Sobue G. Pathogenesis and therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Prog Neurobiol*. 2012;99:246-56. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.007. 査読有

(5) Banno H, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. Pathogenesis and molecular targeted therapy of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Cell Tissue Res*. 2012;349:313-20. doi: 10.1007/s00441-012-1377-9. 査読有

(6) Hama T, Hirayama M, Hara T, Nakamura T, Atsuta N, Banno H, Suzuki K, Katsuno M,

Tanaka F, Sobue G. Discrimination of spinal and bulbar muscular atrophy from amyotrophic lateral sclerosis using sensory nerve action potentials. *Muscle Nerve*. 2012;45:169-74. doi: 10.1002/mus.22291 査読有

(7) Katsuno M, **Banno H**, Suzuki K, Adachi H, Tanaka F, Sobue G. Molecular pathophysiology and disease-modifying therapies for spinal and bulbar muscular atrophy. *Arch Neurol*. 2012;69:436-40. doi: 10.1001/archneurol.2011.2308. 査読有

(8) Hashizume A, Katsuno M, **Banno H**, Suzuki K, Suga N, Tanaka F, Sobue G. Difference in chronological changes of outcome measures between untreated and placebo-treated patients of spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurol*. 2012;259:712-9. doi: 10.1007/s00415-011-6251-2. 査読有

(9) **Banno H**, Katsuno M, Suzuki K, Sobue G. Dutasteride for spinal and bulbar muscular atrophy. *Lancet Neurol*. 2011;10:113-5. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70324-0. 査読有

〔学会発表〕 (計 4 件)

① **坂野晴彦**ら. 嚙下造影 3 回法の信頼性・妥当性の検討、第 53 回日本神経学会学術大会、2012 年 5 月 24 日、東京

② **坂野晴彦**ら. 球脊髄性筋萎縮症における嚙下造影の定性的・定量的解析(第二報)、第 52 回日本神経学会学術大会、2011 年 5 月 19 日、名古屋

③ **坂野晴彦**. 臨床研究に関する倫理指針と臨床試験の実際、第 8 回日本神経学会生涯教育セミナー「レクチャー」、2011 年 5 月 17 日、名古屋

④ **Banno H**, et al. “Effect of Leuprorelin in

Patients with Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA): A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial” 63rd Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Apr. 14th, 2011, Hawaii, USA.

〔図書〕 (計 4 件)

(1) **Banno H**, Katsuno M, Suzuki K, Tanaka F, Sobue G. “Therapeutic Intervention in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA).” From *Motor Neuron Diseases: Causes, Classification and Treatments*. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, p183-196, 2012.

(2) **坂野晴彦**、勝野雅央、鈴木啓介、橋詰淳、祖父江元. 神経変性疾患の分子標的治療への問題点—SBMA を中心に— 北隆館、*BIO Clinica*、p48-52、2012

(3) **坂野晴彦**、勝野雅央、祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症、医歯薬出版、疾患別に診る嚙下障害、p336-341、2012

(4) **坂野晴彦**、井口洋平、勝野雅央、鈴木啓介、祖父江元. 運動ニューロン疾患の病態に基づく画期的治療の開発 中外医学社、*Annual Review 神経* 2011、130-138、2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂野 晴彦 (BANNO HARUHIKO)
名古屋大学・高等研究院 (医)・特任講師
研究者番号：40594057

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし