

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670440

研究課題名(和文) 球脊髄性筋萎縮症におけるクレアチン代謝異常の病態解明と探索的臨床試験

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of creatine metabolism dysregulation in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) and clinical trial of oral creatine for patients with SBMA

研究代表者

勝野 雅央 (Kastuno, Masahisa)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50402566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)では進行に伴い血清クレアチニン(Cr)が低下することが知られている。本研究ではSBMA患者におけるCrおよびその前駆体であるクレアチンの代謝異常の分子メカニズムを明らかにするため、SBMA患者52名を対象とした解析を行った。その結果、SBMA患者における血清CrはALSFRS-Rなどの運動機能指標と強く相関することが示された。さらに、SBMAではALSに比べ血清Crおよび骨格筋内クレアチンが減少しており、その原因としてSBMAでは骨格筋におけるクレアチントランスポーターの発現が低下していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Serum creatinine (Cr) levels decrease with disease progression of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). To elucidate the pathogenesis of creatine-Cr metabolism dysregulation in SBMA, we included subjects with SBMA (n = 52) to assess motor function using functional parameters and measure muscle mass with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). We also examined the intra-muscular creatine concentration and analyzed the expression levels of creatine transporter in skeletal muscle using immunoblotting. Serum Cr levels correlated well with the functional parameters such as ALSFRS-R in SBMA. Both serum Cr and muscular creatine levels were lower in SBMA than in ALS, even though these groups had similar ALST. Furthermore, the expression levels of muscular creatine transporter were decreased in SBMA compared with ALS, providing a molecular basis for the decreased intra-muscular creatine in SBMA.

研究分野：神経内科学

キーワード：球脊髄性筋萎縮症 神経変性疾患 運動ニューロン 骨格筋 クレアチン

### 1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) はアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の CAG 繰り返し塩基配列の異常伸長による神経変性疾患であり、脊髄・脳幹における運動ニューロンの変性に伴う進行性の筋萎縮・筋力低下を呈するが、根本的治療法・対症療法ともに見出されていない。原因蛋白質である変異 AR がリグandであるテストステロンと結合し核内に集積することが SBMA の病態の根幹と考えられており、運動ニューロンと骨格筋の双方において変異 AR がテストステロン依存性に細胞障害を惹起すると考えられている。申請者らはこうした病態に基づいて分子標的治療法のトランスレーショナルリサーチを展開してきた (Katsuno et al., Lancet Neurol 2010; Minamimiyama et al. Nat Med 2013)。一方、緩徐進行性の神経変性疾患に対する治療法開発における病勢や薬効を鋭敏に評価するためのバイオマーカーの必要性が指摘されて久しいが、申請者らは SBMA における最も鋭敏な血清学的バイオマーカーとして血清クレアチニン (Cr) を同定し、本指標が患者の運動機能と相関し、経時的解析においても進行とともに低下することを明らかにした (Hashizume et al., Brain 2012)。Cr はほとんどが骨格筋で産生され、骨格筋へのエネルギーの供給源となるが、申請者の予備的検討において、SBMA における血清 Cr 低値は単に筋肉量の減少を反映するものだけではなく、骨格筋におけるプライマリーな病態を反映している可能性が高いと考えられることから (詳細は後述)、その減少は SBMA における骨格筋病変の分子基盤となっている可能性がある。

### 2. 研究の目的

SBMA の疾患モデルおよび患者組織を用いて SBMA 骨格筋における Cr 代謝異常の分子機構を解明し、SBMA 患者に対するクレアチン補充療法の臨床試験 (フェーズ IIa) を実施し、安全性・用量反応性および有効性について解析し、新規の病態機構の解明と対症療法の開発を進める。

### 3. 研究の方法

**SBMA におけるクレアチン代謝異常のメカニズムの解明:** SBMA 患者の血清 Cr 値低下が骨格筋における Cr 産生量の低下であることを確認するため、患者剖検および生検骨格筋サンプルを用い、Cr 代謝に寄与する分子群の発現量を定量し、SBMA の病態分子経路と Cr 産生抑制の関連を明らかにした。

**SBMA 患者に対するクレアチンのプラセボ対象二重盲検並行群間比較試験:**

SBMA 患者を 15 名ずつランダムにクレアチン 10 g/day、15 g/day およびプラセボに割付け、

試験薬の投与期間は 8 週間とし、投与開始 0, 4, 8, 16 週後に握力や定量的筋力 (MVIC)、運動機能スコア (ALSFRS-R, SBMAFRS など)、臨床検査 (血清 Cr, クレアチニンなど) を評価するとともに、自他覚的所見による安全性の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) SBMA におけるクレアチン代謝異常のメカニズムの解明

遺伝子検査で診断が確定した SBMA 患者 52 名を対象とした。患者の評価時年齢は  $53.0 \pm 10.2$  歳、AR 遺伝子 CAG リピート数は  $47.8 \pm 3.8$ 、評価時 ALSFRS-R は  $40.1 \pm 3.8$  であり、既報告と同等であった。SBMA 患者の血清 Cr は ALSFRS-R などの運動機能と強く相関した。血清 Cr は筋量のみならず腎機能も反映する指標であるため、Cr を他の腎機能マーカーであるシスタチン C で補正した場合にも、同様の相関が確認された (図 1)。

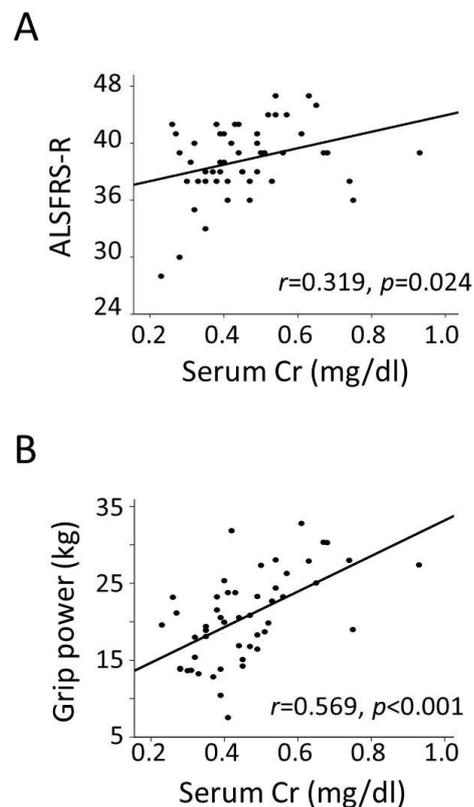
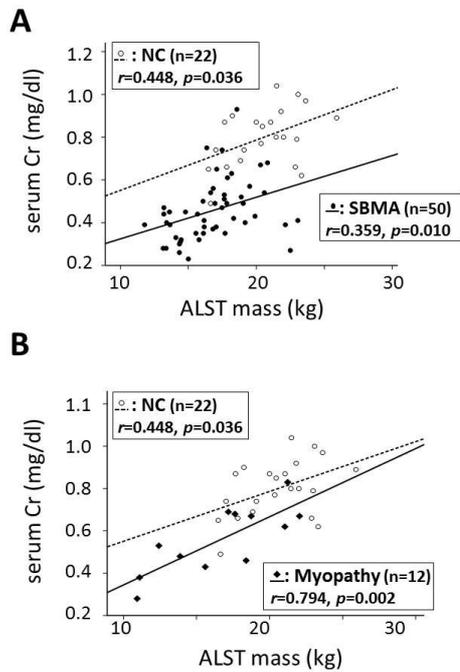


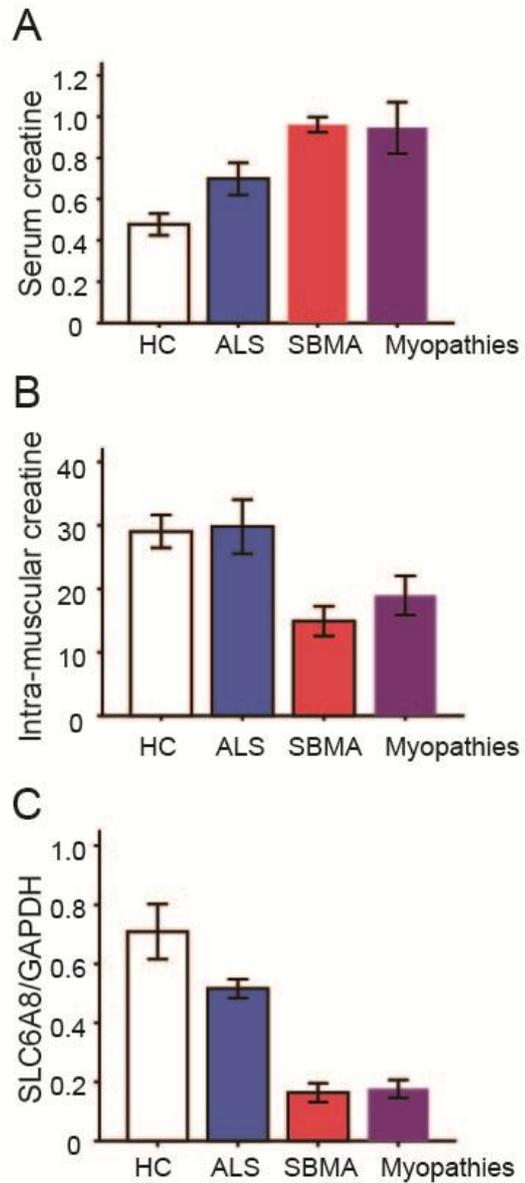
図 1. SBMA 患者における臨床指標と血清 Cr の相関

SBMA 患者では筋量と血清 Cr にも強い相関が認められたが、運動ニューロン疾患である ALS と比較して、筋量の割に血清 Cr が低下していた (図 2)。このことから、SBMA では筋萎縮のみでは説明困難な血清 Cr の低下が認められることが示唆された。



**図 2. 各種疾患および健常者 (HC) における血清 Cr と筋量の関係**

そこで、SBMA におけるクレアチン-Cr 代謝について患者血清および剖検骨格筋サンプルを用いて詳細に検討したところ、SBMA 患者の筋量は ALS、筋疾患と同等であるにもかかわらず、血清 Cr は SBMA 患者において有意に減少していることが明らかとなった。Cr はクレアチントランスポーターによって血清から骨格筋へと取り込まれたクレアチンが、骨格筋内で代謝されることによって産生されるため、次に血清クレアチン濃度を SBMA、ALS、筋疾患で比較したところ、SBMA 患者では Cr の前駆体であるクレアチンの血中濃度が高いことが示された (図 3A)。クレアチンは骨格筋のエネルギー源として利用されることから、この結果は骨格筋におけるクレアチンの利用障害による血中クレアチンの余剰を示唆する。そこで各種疾患における剖検骨格筋内のクレアチン濃度を測定したところ、SBMA 患者では ALS に比べ骨格筋へのクレアチンの取り込みが低下していることが明らかとなった (図 3B)。さらに、その機序を明らかにするため、クレアチントランスポーター (SLC6A8) に対するウエスタンブロットを指向したところ、SBMA 患者の骨格筋におけるクレアチントランスポーターの発現は、ALS や筋疾患に比較して優位に低下していることが明らかとなった (図 3C)。これらのことから、運動ニューロン変性による筋萎縮に加えて、骨格筋におけるクレアチントランスポーターの発現低下によるクレアチン-Cr の代謝異常が血清 Cr に寄与していることが示された。



**図 3. 各種疾患および健常者 (HC) における骨格筋クレアチン-Cr 代謝**

以上の解析結果から、SBMA の病態に運動ニューロン変性と骨格筋変性の両者が寄与しているという病態仮説が患者のバイオサンプルを用いた検討でも指示された。また、本研究により、血清 Cr が運動ニューロン変性と骨格筋病変の双方を反映するバイオマーカーであることが示され、今後の臨床試験における評価指標として利用できると考えられた。また、クレアチンが骨格筋においてエネルギー源として機能することから、クレアチンを補充することが SBMA の治療法開発に繋がると予想される。今後、クレアチン投与による SBMA の神経症状の変化についての検討が必要と考えられる。また、SBMA におけるクレアチントランスポーターの発現低下に関する病態研究も重要である。

(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 7 件) 全て査読あり

1. Hashizume A, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Mano T, Araki A, Hijikata Y, Grunseich C, Kokkinis A, Hirakawa A, Watanabe H, Yamamoto M, Fischbeck KH, Sobue G. (2015) A functional scale for spinal and bulbar muscular atrophy: cross-sectional and longitudinal study. *Neuromuscul Disord*. In press.
2. Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. (2015) Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. *Hum Mol Genet*. 24: 314-329. doi: 10.1093/hmg/ddu445.
3. Oki K, Halievski K, Vicente L, Xu Y, Zeolla D, Poort J, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Wiseman RW, Breedlove SM, Jordan CL. Contractile dysfunction in muscle may underlie androgen-dependent motor dysfunction in SBMA. *J Appl Physiol*. 118(7): 941-952. doi:10.1152/jappphysiol.00886.2014.
4. Tohnai G, Adachi H, Katsuno M, Doi H, Matsumoto S, Kondo N, Miyazaki Y, Iida M, Nakatsuji H, Qiang Q, Ding Y, Watanabe H, Yamamoto M, Ohtsuka K, Sobue G. (2014) Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 23: 3552-3565. doi: 10.1093/hmg/ddu066.
5. Katsuno M, Watanabe H, Yamamoto M, Sobue G. (2014) Potential therapeutic targets in polyglutamine-mediated diseases. *Expert Rev Neurother*. 14: 1215-1228. doi:10.1586/14737175.2014.956727.
6. Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. (2014) Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy. *Endocrinology*. 155: 2624-2634. doi: 10.1210/en.2013-1756.
7. Araki A, Katsuno M, Suzuki K, Banno H, Suga N, Hashizume A, Mano T, Hijikata Y, Nakatsuji H, Watanabe H, Yamamoto M, Makiyama T, Ohno S, Fukuyama M,

Morimoto S, Horie M, Sobue G. (2014) Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurology*. 82: 1813-1821. doi: 10.1212/WNL.0000000000000434.

[学会発表](計 6 件)

1. 勝野雅央. 神経変性疾患に対する医師主導治験. 第 11 回医薬品評価フォーラム, 東京都, 渋谷区, 日本薬学会長井記念館, 2014.4.24. (招待講演)
2. Katsuno M. Molecular pathway and therapeutic strategies for motor neuron diseases. The 5th East Asia Neurology Forum (EANF), Kaoshiung, Taiwan, 2014.4.12. (招待講演)
3. 勝野雅央, 鈴木啓介, 坂野晴彦, 須賀徳明, 橋詰 淳, 荒木 周, 土方靖浩, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症患者の進行に対する各種薬剤の影響. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡県, 福岡市, 福岡サンパレス, 2014.5.21-5.24. (ポスター)
4. 荒木周, 中辻秀朗, 勝野雅央, 鈴木啓介, 坂野晴彦, 須賀徳明, 橋詰淳, 土方靖浩, 祖父江元. 運動ニューロン疾患における耐糖能異常の解析. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡県, 福岡市, 福岡サンパレス, 2014.5.21-5.24. (ポスター)
5. 土方靖浩, 勝野雅央, 鈴木啓介, 坂野晴彦, 須賀徳明, 橋詰淳, 荒木周, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症におけるクレアチン代謝異常. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡県, 福岡市, 福岡サンパレス, 2014.5.21-5.24. (ポスター)
6. 中辻秀朗, 荒木 周, 勝野雅央, 鈴木啓介, 坂野晴彦, 須賀徳明, 橋詰 淳, 土方靖浩, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) におけるインスリン抵抗性と運動機能の関連. 第 55 回日本神経学会学術大会, 福岡県, 福岡市, 福岡サンパレス, 2014.5.21-5.24. (ポスター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

勝野 雅央 (Katsuno Masao)  
名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号: 50402566

### (2) 研究分担者

祖父江 元 (Sobue Gen)  
名古屋大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 20148315