

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293206

研究課題名(和文) 運動ニューロン疾患における神経・筋システム変性の分子病態解明と治療法開発

研究課題名(英文) Therapy development for neuromuscular degeneration in motor neuron diseases

研究代表者

勝野 雅央 (KATSUNO, Masahisa)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50402566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症のモデルマウスにアンドロゲン受容体(AR)に対するアンチセンス核酸を脳室内投与したところ、神経症状と病理所見が改善し、変異ARが中枢神経で毒性を発揮することが示された。その分子機構としてDNAメチル化異常が示唆された。SBMAの神経変性と筋変性に共通する分子機序として、ミトコンドリア機能低下やNFkBシグナル異常などをみとめ、PPARGgammaアゴニスト投与によりこれらの分子異常が抑制された。

研究成果の概要(英文)：We exploited antisense oligonucleotides (ASOs) to inhibit mutant androgen receptor (AR) RNA levels in the central nervous system and explored its therapeutic effects in the model mouse of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) that harbors mutant AR gene with 97 CAGs. Intracerebroventricular ASO administration in the SBMA mice efficiently suppressed the mutant gene expression in the central nervous system, highlighting the neurotoxicity of mutant AR in motor neurons. RG108, an inhibitor of DNA methylation suppressed motor neuron degeneration in the SBMA mouse, suggesting that the mutant AR-induced hypermethylation of DNA is implicated in the pathomechanism of SBMA. Both motor neurons and skeletal muscles of the SBMA mouse showed mitochondrial dysfunction, up-regulation of oxidative stress, and activation of NFkB signaling, all of which were mitigated by a PPARGgamma agonist pioglitazone, suggesting common molecular pathways in the neuro-muscular degeneration in SBMA.

研究分野：神経内科学

キーワード：運動ニューロン 骨格筋 エピジェネティクス ミトコンドリア NFkB

1. 研究開始当初の背景

運動ニューロン疾患は上位および下位運動ニューロンの両方あるいはいずれかが障害される神経変性疾患であり、進行性の筋力低下・筋萎縮・呼吸筋麻痺・嚥下機能障害などを呈する致命的疾患である。成人発症の運動ニューロン疾患の大多数は筋萎縮性側索硬化症 (ALS) および球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) であるが、これらの疾患における運動ニューロン変性過程の分子機構には依然として不明な点が多く、いずれも根本治療法はない。運動ニューロンの変性に伴い骨格筋萎縮が誘導される一方、骨格筋は trophic factor を供給しており、両者は「神経筋システム」として機能的に強く関連していることが知られている。しかし、運動ニューロン疾患において神経・筋システムがどのような分子メカニズムにより変性に陥るかは不明である。

2. 研究の目的

運動ニューロン疾患における神経・筋システム変性に寄与する分子変化を同定し、運動ニューロン・骨格筋クロストークの異常を標的とした治療法を開発する。とくに運動ニューロン疾患における神経・筋システム変性を惹起する細胞内シグナルおよび細胞間シグナルを明らかにすることを目的とする。SBMA マウスを用いた既報告において、アンチセンス核酸 (ASO) を用いて末梢組織 (非神経組織) においてのみ SBMA の原因遺伝子である変異アンドロゲン受容体 (AR) を抑制すると、運動機能や病理所見が改善することが示されているため、本研究では別の ASO を脳室内投与することで、神経組織においてのみ変異 AR を抑制した際の効果を検討することで、変異 AR の中枢神経毒性を明らかにすることを試みた。また、ポリグルタミン病ではニューロンにおける転写機能異常が病態の中心と考えられていることから、変異 AR によるニューロンのエピゲノム変化を解析した。また、治療法開発として、SBMA の神経・筋変性に対する PPAγ アゴニストおよびペオニ化合物の効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 変異 AR の中枢神経毒性

チキン beta-actin プロモーター下でヒト変異 AR を発現するトランスジェニックマウス (AR-97Q マウス、以下 SBMA マウス) に対し、AR をノックダウンする ASO を、5 週齢時に 2.0-6.0 mg/kg、側脳室内 (ICV) 注射投与を行い、症状と病理所見を解析した。症状については生存期間、体重、ロータロッドを評価し、病理所見としては ChAT 免疫染色により運動ニューロンの萎縮の程度を、GFAP 免疫染色で反応性アストロサイトーシスの程

度を評価するとともに、ニューロフィラメント、synaptophysin、alpha-bungarotoxin の三重染色による神経筋接合部における脱神経の評価を行なった。

(2) SBMA におけるエピジェネティクス異常

SBMA モデルマウス脊髄サンプルを用いて DNA メチル化酵素 (Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b) の発現量を定量した。次に SBMA モデル細胞を DNA メチル化阻害剤である RG108 で処理し、WST-8 アッセイにて細胞活性を解析した。さらに RG108 を、0.5mg/dl, 2mg/dl の 2 段階の濃度で発症前の 6 週齢から 2 週間持続的に SBMA モデルマウスの脳室内に投与し、運動解析を行うとともに病理学的、生化学的解析を行った。さらに DNA メチル化解析を行い、異常メチル化を有する遺伝子の同定を行った。

(3) SBMA の神経筋変性に対する治療法開発

SBMA モデルマウスに PPAγ アゴニストである pioglitazone (PG) を経口投与し、運動機能や生存率、病理組織変化を解析した。さらに PG の作用機序として、マウスモデルと細胞モデルにおけるミトコンドリア機能、グリア細胞の形態および NFκB シグナルの変化などを解析した。

また分子シャペロン Hsp70 の発現を誘導することが知られているペオニ化合物である Paeoniflorin (PF) を SBMA モデルに投与し、運動障害などの表現型への影響と、組織における変異 AR とタンパク質分解機構に関わる分子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) ASO を用いた変異 AR の運動ニューロン毒性に関する検討

ASO の ICV 単回投与による SBMA マウス治療効果：定位脳手術及び ASO-AR1 投与の生体忍容性が示され、ASO は効率的に脳、脊髄に局限して変異 AR mRNA 発現を抑制した。効果は少なくとも 5 週間、減衰することなく持続した (図 1)。

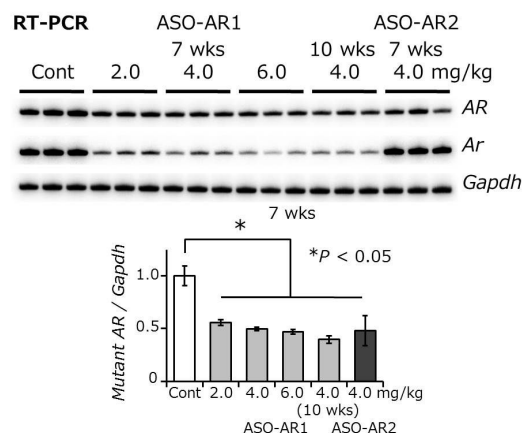


図1. AR-ASOの遺伝子発現抑制効果

しかし骨格筋、肝といった末梢臓器に対するノックダウン効果は得られず、本 ASO が中枢神経系においてのみ変異 AR の発現を抑制することが確認された。ASO-AR1 及び AR2 共、運動機能障害の発症及び進行を遅らせ、体重増加、延命効果をもたらした(図 2)。組織学的検討などにより、ASO-AR1 は脊髄運動ニューロンの核内封入体形成及び、ニューロン変性を抑制した。大腿四頭筋では凝集体形成の程度に差はみられなかったが、神経原性筋萎縮の抑制及び筋線維径の増大が認められ、さらに脱神経筋線維の減少が確認された。また神経筋接合部のアセチルコリン受容体形態の断片化、節前神経の脱神経が有意に減少した。ASO による血清テストステロン値の変化はみられなかった。さらに野生型マウスに対する有害な影響はなかった。

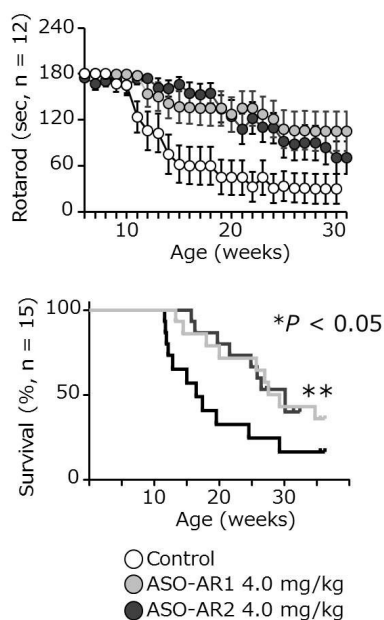


図2. AR-ASOのSBMAモデルマウスに対する効果

(2) SBMA におけるエピジェネティクス異常

SBMA モデルマウス脊髄運動ニューロンにおいて DNA の異常メチル化が起こっているか否かを検証するために、免疫組織化学にて DNA メチル化の指標である 5 メチルシトシンの発現を解析したところ、野生型マウスと比較して SBMA モデルマウスにおいて 5 メチルシトシンの発現量には差がないことが示された。一方、DNA メチル化酵素のひとつである Dnmt1 の発現量は SBMA マウスの脊髄運動ニューロンで増加していた(図 3)。

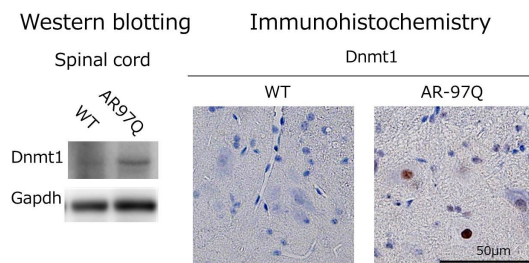


図3. SBMAマウス脊髄におけるDnmt1の発現量増加

では Dnmt1 の増加に伴う DNA メチル化の亢進が病態に関与しているという仮説を立て、Dnmt1 の発現を抑えることが SBMA に治療効果を示すのではないかと考えた。培養細胞を用いて siRNA を利用した解析を行ったところ Dnmt1 をノックダウンした SBMA モデル細胞では有意に細胞活性が改善することが判明した。同時に行った Dnmt3a および Dnmt3b のノックダウン実験では細胞活性は改善を認めなかった。さらに薬剤での同様の機序の治療効果を期待して、DNA メチル化阻害剤である RG108 で SBMA モデル細胞を処理したところ、コントロールとして DMSO で処理した SBMA モデル細胞に比べて RG108 で処理した SBMA モデル細胞は細胞活性が高いことが確認された。同様の治療効果がモデルマウスにおいても示されるか否かを検証するために SBMA モデルマウス脳室内に RG108 を投与したところ、コントロールとして生理食塩水を投与した SBMA モデルマウス群と比較して、RG108 を脳室内投与した SBMA モデルマウス群(治療群)では有意に生存率が改善し(図 4)、体重、握力、およびロータロッド試験の結果も治療群で有意に改善するなど運動症状の進行抑制が示された。

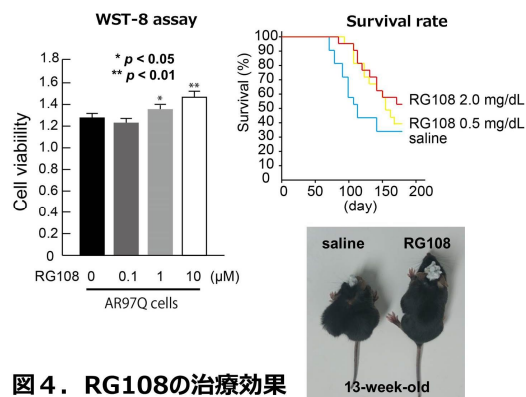


図4. RG108の治療効果

さらに治療群とコントロール群のモデルマウスの病理組織学的、生化学的解析を行ったところ、SBMA の病理学的マーカーである変異 AR の脊髄における発現量とポリグルタミンが集積した凝集体の量は両群に差がないことが判明した。しかし運動ニューロンのマーカーである ChAT の抗体を用いてウエスタンブロット、免疫組織化学を行ったところ、RG108 脳室内投与群で有意に ChAT の発現量が多いことが分かった。このことは RG108 が異常タンパク質の凝集量に影響を与えずに運動ニューロンの変性を抑制したことを示唆している。

(3) SBMA の神経筋変性に対する治療法開発

マウス運動神経株化細胞である NSC34 とマウス筋芽細胞である C2C12 に対して変異 AR の一過性強制発現を行い、24CAG リピートを有する正常細胞モデルと 97CAG リピ-

トを有する SBMA 細胞モデルを作成し、各細胞モデルにおける PPAR γ の発現量を検討した。SBMA 細胞モデルではコントロールと比較して PPAR γ の発現量が低下し細胞活性は低下していた。そこで各細胞に PPAR γ を一過性強制発現させると、細胞活性が改善し毒性の低下をみとめた。さらに SBMA 細胞モデルに PPAR γ agonist である PG を投与すると、PPAR γ の発現は上昇し細胞活性の改善や細胞死の減少をみとめた。次に、SBMA マウスモデル (AR-97Q) における PPAR γ の発現量をウエスタンブロットにより測定すると、野生型マウスと比較して SBMA マウスモデルの脊髄と骨格筋において PPAR γ の発現が低下し、これは SBMA 細胞モデルにおける変化と合致していた。運動解析では SBMA マウスモデルの PG 投与群 (n=20) では対照群 (n=21) と比較して体重・握力・ロタロッド運動試験において有意な改善をみとめ、寿命短縮を抑制した (図 5)。PG を発症後 (8 週齢) から投与開始した群においても、コントロール群と比較して運動機能の有意な改善をみとめた。

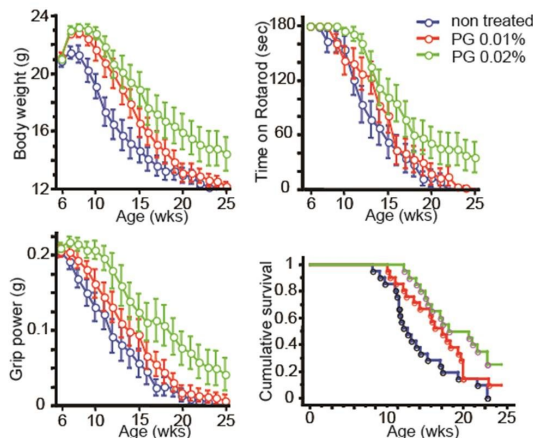


図5. SBMAマウスに対するピオグリタゾンの効果

組織学的には脊髄、骨格筋とも核内で異常に凝集したポリグルタミンの量は治療前後で変化はみとめなかったが、ニューロンの萎縮、アストロサイトの数、筋萎縮は野生型と比較して SBMA マウスモデルで悪化し、PG の治療により改善した。そこで PG の作用機序について過去の文献を参考にして、SBMA 細胞モデルとマウスモデルにおけるミトコンドリア機能・NF κ B シグナルなどについて解析した。まず Mitotracker を用いてミトコンドリア機能を測定すると、SBMA 細胞モデルではミトコンドリア機能が低下し PG 投与により改善した。また SBMA マウスモデルの脊髄と骨格筋では酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG や Nitrotyrosine の発現が上昇し、さらに SBMA モデルマウスの尿中 8-OHdG は野生型マウスと比較して上昇し、PG 投与により低下した。NF κ B シグナルに

ついては SBMA 細胞モデルとマウスモデルにおける核内 NF κ Bp65 と細胞質内 pI κ B の発現量をウエスタンブロットと免疫染色で解析した。SBMA 細胞モデルとマウスモデルでは NF κ B シグナルの活性化をみとめ、これらは PG の治療により改善した (図 6)。

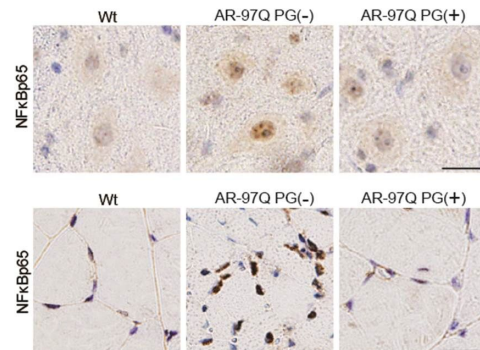


図6. SBMAマウスにおけるNF κ Bシグナル活性化

最後にモデルマウスの脊髄においてグリア細胞の免疫染色を行った。SBMA マウスモデルの脊髄では炎症を惹起する M1 グリア細胞の数が上昇し、炎症に対して保護的に働く M2 グリア細胞の数が低下していた。PG 投与により M1 グリア細胞は減少し、M2 グリア細胞は増加した。

Paeoniflorin (PF) については、SBMA マウスモデルに生後 5 週齢より 6.7mg/kg (PF \times 1) または 13.4mg/kg (PF \times 2) を毎日腹腔内投与しその効果を検討した。SBMA マウスの病態進行は Rotarod、生存率などのパラメーターで解析し、PF 投与により有意な改善が見られた (図 7)。

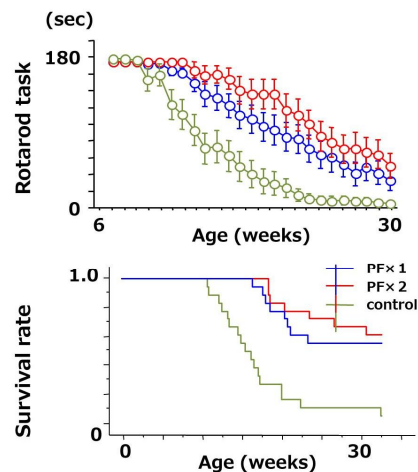


図7. SBMAマウスに対するPaeoniflorinの効果

また、16 週令の SBMA マウスの脊髄及び骨格筋で抗ポリグルタミン抗体である 1C2 を用いて免疫染色を行うと 1C2 陽性細胞数は PF 投与により減少した。ウエスタンブロット解析においてもマウス組織で PF 投与により AR タンパク質の発現量が減少しており、

培養細胞と同じく NF-YA、TFEB、Hsp70、CHIP 各タンパク質の発現量増加も見られた。

以上の検討により、変異 AR の中枢神経毒性が示され、治療標的となることが明らかになった。また中枢神経に限局した内因性 AR のノックダウンの影響は、異常 AR 発現の影響と比し軽微であることが示唆された。近年、SBMA では、支配下骨格筋から運動ニューロンへの逆行性の神経栄養因子の供給不足が、運動ニューロンの非細胞自律的変性をきたす病態が唱えられている(Cortes et al. 2014)。しかし本研究の成果より、変異 AR の神経毒性による細胞自律的変性が下位運動ニューロン変性をもたらし、二次性に神経筋接合部の脱神経、神経原性筋萎縮をおこす機序も示された。また、DNA メチル化阻害剤である RG108 が SBMA モデル細胞、モデルマウスへの治療効果を示したことから、DNA メチル化異常が変異 AR の中枢神経毒性に関与している可能性が示唆された。さらに、SBMA の神経変性と筋変性に共通する分子機序として、ミトコンドリア機能の低下、NFκB シグナル活性化、グリア細胞の変化をみとめ、PPARGγ アゴニストである PG 投与によりこれらの分子異常が抑制された。SBMA 患者の脊髄と骨格筋の剖検組織においても、PPARGγ の発現低下と NFκB シグナルの上昇をみとめ、実験結果と一致していた。PG は糖尿病治療薬として使用され安全性が示されており、SBMA に対する治療薬としても期待されると考えられる。さらに NFκB シグナルは SBMA における新たな治療ターゲットになりうると考えられた。また、PF がタンパク質分解機構を活性化することで変異 AR の分解を促進し、SBMA の病態を改善す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 27 件) 全て査読有

1. Yamada S, Hashizume A, Hijikata Y, Inagaki T, Suzuki K, Kondo N, Kawai K, Noda S, Nakanishi H, Banno H, Hirakawa A, Koike H, Halievski K, Jordan CL, Katsuno M, Sobue G. Decreased Peak Expiratory Flow Associated with Muscle Fiber-Type Switching in Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. **PLoS One**. 11(12): e0168846, 2016.
2. Iguchi Y, Eid L, Parent M, Soucy G, Bareil C, Riku Y, Kawai K, Takagi S, Yoshida M, Katsuno M, Sobue G, Julien JP. Exosome secretion is a key pathway for clearance of 1 pathological TDP-43. **Brain** 139(Pt 12): 3187-3201, 2016.
3. Hijikata Y, Katsuno M, Suzuki K, Hashizume A, Araki A, Yamada S, Inagaki T, Iida M, Noda S, Nakanishi H, Banno H, Mano T, Hirakawa A, Adachi H, Watanabe H, Yamamoto M, Sobue G. Impaired muscle uptake of creatine in spinal and bulbar muscular atrophy. **Ann Clin Transl Neurol**. 3(7): 537-546, 2016.
4. Sahashi K, Katsuno M, Hung G, Adachi H, Kondo N, Nakatsuji H, Tohnai G, Iida M, Bennett CF, Sobue G. Silencing neuronal mutant androgen receptor in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. **Hum Mol Genet**. 24(21): 5985-5994, 2015.
5. 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. A functional scale for spinal and bulbar muscular atrophy: cross-sectional and longitudinal study. **Neuromuscul Disord**. 25(7): 554-562, 2015.
6. Udagawa T, Fujioka Y, Tanaka M, Honda D, Yokoi S, Riku Y, Ibi D, Nagai T, Yamada K, Watanabe H, Katsuno M, Inada T, Ohno K, Sokabe M, Okado H, Ishigaki S, Sobue G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. **Nat Commun**. 6:7098, 2015.
7. Sasaki S, Iguchi Y, Katsuno M, Sobue G. Alterations in the blood-spinal cord barrier in TDP-43 conditional knockout mice. **Neurosci Lett**. 598: 1-5, 2015.
8. 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, 2015.
9. Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Ikenaka K, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. Pioglitazone suppresses neuronal and muscular degeneration caused by polyglutamine-expanded androgen receptors. **Hum Mol Genet**. 24(2) :314-329, 2015.
10. Katsuno M, Watanabe H, Yamamoto M, Sobue G. Potential therapeutic targets in polyglutamine-mediated

- diseases. **Expert Rev Neurother.** 14: 1215-1228, 2014.
11. 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. Brugada syndrome in spinal and bulbar muscular atrophy. **Neurology.** 82: 1813-1821, 2014.
 12. Renier KJ, Troxell-Smith SM, Johansen JA, Katsuno M, Adachi H, Sobue G, Chua JP, Sun Kim H, Lieberman AP, Breedlove SM, Jordan CL. Anti-androgen flutamide protects male mice from androgen-dependent toxicity in three models of spinal bulbar muscular atrophy. **Endocrinology.** 155: 2624-2634, 2014.
 13. 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. Paeoniflorin eliminates a mutant AR via NF-YA-dependent proteolysis in spinal and bulbar muscular atrophy. **Hum Mol Genet.** 23: 3552-3565, 2014.
 14. Chua JP, Reddy SL, Merry DE, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Robins DM, Lieberman AP. Transcriptional activation of TFE3/ZKSCAN3 target genes underlies enhanced autophagy in spinobulbar muscular atrophy. **Hum Mol Genet.** 23: 1376-1386, 2014.
 15. Mano T, Katsuno M, Banno H, Suzuki K, Suga N, Hashizume A, Araki A, Watanabe H, Tanaka S, Yamamoto M, Sobue G. Tongue pressure as a novel biomarker of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). **Neurology** 82: 255-262, 2014.

〔学会発表〕(計 20 件)

1. 勝野雅央. 神経変性疾患の発症前病態と先制治療の開発, 招待講演, 日本内科学会東海支部主催第 66 回生涯教育講演会, 2016/10/16, 名古屋国際会議場(愛知県 名古屋市)
2. Katsuno M. Potential therapeutic targets in polyglutamine-mediated diseases, 招待講演, International Asidan Symposium on Asida River/Japan, 2016.7.1-2. ホテル鷗風亭(広島県 福山市)
3. 中辻秀朗, 勝野雅央, 近藤直英, 藤内玄規, 佐橋健太郎, 飯田円, 祖父江元. The effect of exercise in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy, 口演, 第 57 回日本神経学会学術大会,

2016/5/18-21, 神戸コンベンションセンター(兵庫県 神戸市)

4. Katsuno M. Application of biomarkers for early-stage of spinal and bulbar muscular atrophy to clinical trials, 招待講演, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/18-21, 神戸コンベンションセンター(兵庫県 神戸市)
5. 佐橋健太郎, 勝野雅央, Gene Hung, 足立弘明, 近藤直英, 中辻秀朗, 藤内玄規, 飯田円, C. Frank Bennett, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症の中枢神経病態に対する標的治療, 口演, 第 33 回日本神経治療学会総会, 2015/11/26-28, 名古屋国際会議場(愛知県 名古屋市)
6. 佐橋健太郎, 勝野雅央, Gene Hung, 足立弘明, 近藤直英, 中辻秀朗, 藤内玄規, 飯田円, C. Frank Bennett, 祖父江元. Silencing neuronal mutant AR suppresses neuropathogenesis in an SBMA mouse model, 口演, 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015/5/20-23, 朱鷺メッセ(新潟県 新潟市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝野 雅央 (KATSUNO, Masahisa)
名古屋大学・大学院医学系研究科・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・大学院医学系研究科・特任教授
研究者番号: 20148315

近藤 直英 (KONDO, Naohide)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 20725527

佐橋 健太郎 (SAHASHI, Kentaro)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号: 90710103

(3) 連携研究者

岡田 洋平 (OKADA, Yohei)
愛知医科大学・医学部・特任准教授
研究者番号: 30383714