

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461268

研究課題名(和文) アンチセンス核酸を用いた運動ニューロン疾患の病態、治療研究

研究課題名(英文) Dissection of the pathomechanisms of motor neuron disease using antisense therapeutics

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)はアンドロゲン受容体(AR)遺伝子変異により、運動細胞及び筋肉が侵され筋力低下をきたす。異常ARタンパク質が毒性を発揮し発病するが、中心的な病変部位は不明である。アンチセンス核酸(ASO)は遺伝子の発現制御を可能にし、治療研究に活用されている。我々はSBMAマウスにARの発現を抑えるASOを投与し、重要な治療標的臓器を検討した。マウス脳室内にASOを投与し脳脊髄の異常ARの発現を抑えたところ、脊髄運動細胞、筋肉などの異常を改善し、運動機能改善、体重増加、延命をもたらした。以上より変異ARの神経毒性が認識され、SBMAに対するASOによる神経治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy or SBMA results from mutations in the AR gene and elicits motor deficits due to lower motor neuron and muscle degeneration. Toxicity of abnormal AR protein causes SBMA, but the primary pathogenic region remains elusive. Antisense oligonucleotides (ASOs) can control gene expression and contribute to identification of the target for the development of therapeutics. Here we have found that an intracerebroventricular injection of ASOs suppressing AR expression in the central nervous system, improves motor function, weight gain and survival with the amelioration of neuronal histopathology in an SBMA mouse model, focusing the neurotoxicity of mutant AR as a therapeutic target. This study further supports the applicability of antisense therapeutics for SBMA.

研究分野：運動ニューロン疾患

キーワード：球脊髄性筋萎縮症 運動ニューロン疾患 アンチセンス核酸

## 1. 研究開始当初の背景

球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は遺伝性神経変性疾患であり、原因遺伝子アンドロゲン受容体(AR)上の翻訳領域における CAG 三塩基繰り返し配列(リピート)の異常延長に起因する。CAG 配列がアミノ酸であるグルタミンに翻訳されることで異常伸長ポリグルタミンを含有する病因タンパク質が産生され、ポリグルタミン病と呼ばれる。

SBMA では主に、選択的に脆弱下位運動ニューロン・グリア細胞内に、誤って折り畳まれた変異 AR タンパク質を含む、特有タンパク質の不溶性凝集体が蓄積する。アンドロゲン依存的に変異 AR が核内から細胞質に移行、集積し、その結果、核内に凝集体が形成されており、これが主に機能獲得型の毒性を発揮することで、転写や細胞シグナル経路を阻害し、最終的に細胞死をきたすと考えられている。またタンパク質凝集体は様々なタンパク質や RNA を捕捉するため、さらに別の細胞機能の変化をきたす。さらに同時に、SBMA では正常 AR タンパク質の機能喪失や逆に機能亢進に伴う病態も認められている。

AR は中枢神経内だけでなく骨格筋、膵臓、心筋など様々な臓器、細胞に広く発現しているが、変異 AR タンパク質は少なくとも下位運動ニューロン、骨格筋において強い毒性病態を発揮している。しかし SBMA における、選択的細胞変性のプロセスのほか、変異 AR に対する下位ニューロンの細胞脆弱性に関しては未解決のままである。

一方、近年モデルマウスを用いた病態、治療研究などにより、変異 AR タンパク質の毒性による、骨格筋における病変が SBMA 病態形成の中心を担う可能性が報告されている。しかし、これはヒトとは異なり、著明な筋症状を呈しているいくつかのモデルマウスに、むしろ強く表現されている病態の可能性も指摘されている。さらに他のポリグルタミン病と同様に、変異 AR タンパク質だけでなく、CUG 異常伸長 AR mRNA の毒性に伴う病態惹起の可能性も示唆されている。AR タンパク質の核内移行を標的とした治療は、現在のところ臨床試験においては、モデルマウスで見られた程の著しい有効性が示されておらず、根治療法の開発が待たれる。SBMA では病理形成の起点、運動ニューロン病態と骨格筋病態の相異性や優位性、中心的な病態形成臓器、成人発症機序などは依然明らかになっておらず、治療法開発のため標的となる、病態のさらなる解明が喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

SBMA におけるタンパク質、RNA 毒性の病態の点より、変異タンパク質だけでなく、タンパク質産生の上流に位置する、異常 AR mRNA を標的としたノックダウンが治療上重要である可能性がある。近年、バイオテクノロジーの進歩のもと、アンチセンス核酸

(ASO)は生体内での標的臓器に、様々な発達時期や疾患病期に、RNA 発現やスプライシングなどの RNA 機能のコントロールを可能にしており、*in vivo* 動物モデルや患者における病態解明、標的治療研究に高く応用されている。この有用性を利用して、高効率 ASO を用いて、我々の SBMA モデルマウスの臓器における変異 AR RNA の特異的ノックダウンを通じて、中心的な病態形成臓器と、AR 下流のシグナル伝達経路も含めた分子病態ネットワークを解明し、さらに ASO を用いた新規治療法の開発を目指すことを主研究目的とした。具体的に以下(1)、(2)の課題を遂行し、貴重な研究成果が得られた。

(1) ASO を用いて SBMA モデルマウスにおける分子病態を明らかにし、ASO 治療法開発を目指す：

SBMA モデルマウスに、ASO を中枢神経内あるいは末梢全身投与し、臓器別のヒト AR のノックダウン効率、表現型に対する治療効果を解析する。最終的に SBMA 病態の中心となる臓器と、最適の ASO 投与量、治療時期、投与経路を見出し、重要な治療標的臓器を明らかにする。

(2) 運動ニューロン病態を解明する：

主な分子病態とされる変異 AR による、転写障害から細胞変性にいたる経路を解明する。SBMA 患者では、AR 核内凝集体形成が下位運動ニューロンで著しくみられ、同ニューロン変性及び脱落も高度である。SBMA マウスと ASO 治療 SBMA マウスの脊髄 mRNA を用いた網羅的遺伝子発現解析を行い、AR 下流のシグナル伝達経路など分子ネットワークを明らかにし、ニューロン死の機序を解き明かす。

## 3. 研究の方法

(1) SBMA モデルマウスにおける病態、ASO 治療研究：

Huvec 細胞を用いた ASO のスクリーニングにより、高効率に AR をノックダウンする候補 ASO(: ASO-AR1、ASO-AR2)を同定したのち、SBMA マウスの発病前の 5 週齢時に、2.0、4.0、6.0 mg/kg の ASO を定位脳手術により単回側脳室内(ICV)ボラス注射投与を行う。また ASO の末梢投与として、計 200、400、800 mg/kg(200 mg/kg/週)の腹腔内(IP)注射投与を行う。ASO は成熟マウス血液脳関門を通過できないため、IP 末梢投与された ASO は中枢神経にデリバリーされなく、その分布、薬理作用は末梢臓器に限られることになる。

(2) 脊髄を用いた網羅的遺伝子発現解析：

AR 自身が転写因子であり、SBMA では転写障害が病態上、重要であると考えられている。コントロールである SBMA マウスと、ICV ASO 治療された SBMA マウスの、下位運動ニューロンを含む脊髄から mRNA を抽出、

精製し、Agilent マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、変異 AR 発現に続く、ニューロンの機能障害と変性をおこす、下流の分子経路の解明を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) ASO の ICV 単回ボラス投与による SBMA マウス治療効果：

定位脳手術及び、投与 ASO-AR1 によるマウス生体忍容性が示すことができた上、radio active RT-PCR により、ASO は効率的に脳、脊髄に限局して、用量依存的に変異 AR mRNA 発現を抑制することを確認できた。この中枢神経効果は少なくとも投与後 5 週間、減衰することなく持続していた(図 1)。また変異 AR タンパク質レベルでも同様に、免疫プロットにより有意なノックダウン効果がみられた。しかし四肢骨格筋、肝臓といった末梢臓器に対する ICV 投与 ASO-AR1 の AR RNA ノックダウン効果は得られず、ICV 投与 ASO 組織内分布の程度に依存していることが判明した。

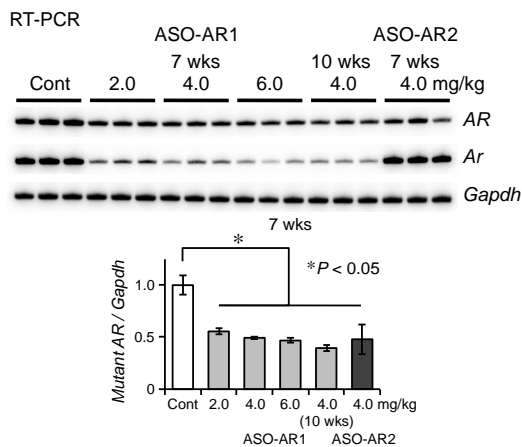


図 1 : SBMA マウス脊髄での ICV 投与 ASO の AR ノックダウン効果

マウス表現型に関しては、ASO-AR1、ASO-AR2 とも ICV 投与により、手握力、ロタロッド運動試験の経時的結果から、運動機能障害の発症及び進行を有意に遅らせ、また有意な体重増加、延命効果をもたらすことが示された(図 2)。

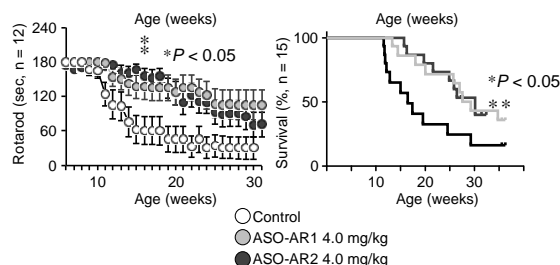


図 2 : ICV 投与 ASO の SBMA マウス運動機能、寿命改善効果

また組織学的、生化学的検討により、

ASO-AR1 は13週齢時における脊髄アルファ運動ニューロンの核内封入体形成及び、同ニューロンの萎縮、変性を抑制していた。さらに組織学的に運動ニューロン周囲のグリオシスの軽減も確認された。一方で、大腿四頭筋では核内凝集体形成の程度に対する効果はみられなかったものの、神経原性筋萎縮の抑制及び筋線維径の増大(コントロール  $906 \pm 602 \mu\text{m}^2$  vs. ICV ASO 治療群  $1287 \pm 504 \mu\text{m}^2$ )が認められ、また、脱神経筋線維の減少が myogenin 染色、同免疫プロットで確認された。加えて、頭頸部に存在する頭最長筋の神経筋接合部(NMJ)を共焦点顕微鏡(Zeiss LSM 710)で形態観察したところ、SBMA でみられる、後シナプスのアセチルコリン受容体形態の断片化が有意に減少し、また節前神経の NMJ 脱神経が有意に減少し、NMJ 病理が ASO により改善していた。ICV 投与された ASO-AR1 の脊髄における免疫反応の誘導はごく軽微であり、また同治療による血清テストステロン値の変化は認められなかったため、本 ASO 効果はアンドロゲン関連性ではなかった。さらに野生型 C57/BL6 マウスに ASO-AR1 4.0 mg/kg を ICV 投与したところ、SBMA マウスと同様に脊髄におけるマウス内因性マウス Ar の発現を抑制していたが、手握力、ロタロッド運動試験、体重増加、寿命などの表現型に対する有害な影響はなかった。

以上より ASO-AR1、ASO-AR2 の中枢神経内投与が忍容性をもって我々の SBMA モデルマウスの運動症状、寿命などを改善することが判明した。よって変異 AR RNA 及びタンパク質の中枢神経毒性が示され、これらが治療標的となることが明らかにされた。また生後マウスにおいて、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 発現の影響と比してごく軽微であることが示唆された。近年モデルマウスを用いた研究などにより、SBMA 骨格筋病変のため、支配下骨格筋から脊髄運動ニューロンへの逆行性の IGF-1、VEGF など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という病態が唱えられている(Cortes et al (2014). *Neuron*.)。しかし我々の SBMA マウスに対する ASO 治療研究の成果より、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す、二次的に神経筋接合部における脱神経と、骨格筋における神経原性筋萎縮をおこす機序も見出された。

(2) ASO の末梢全身投与の効果の検討：

5週齢時より ASO 200 mg/kg/週、1-4 週間 IP 投与を SBMA マウスに施行した。末梢臓器における変異 AR のノックダウン効果は、radio active RT-PCR により、最終投与 2 週後の肝臓においては有意に認められたが、骨格筋では明らかな効果は得られなかった。その理由

として、IP 投与 ASO の骨格筋への組織内分布・取込み能が十分ではなかったこと、内因性マウス Ar への、ASO のオフターゲット的捕捉により変異 AR への結合分布量が制限されてしまったこと、骨格筋における ASO 半減期が短かったこと、投与量及び方法が最適ではなかったこと、などの可能性が考えられた。また同様に、IP 投与 ASO の、SBMA モデルマウスの運動症状、体重、寿命のいずれに対する効果も有意ではなかった。現在、候補 ASO の化学修飾や配列の変更、ASO 投与量、投与時期、局所筋肉注射など投与ルートや、IP-ICV の併用療法などを再考し、末梢投与 ASO の治療反応性の最適化を目指している。

(3) ASO を用いた、変異 AR による運動ニューロンにおける転写障害機序の解明：  
10 週齢時のコントロール SBMA マウス及び ASO-AR1 4.0 mg/kg ICV 治療 SBMA マウス (投与 2 週間後) の胸髄より mRNA を抽出し、Agilent マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、変異 AR 下流のシグナル経路に位置する治療標的分子及び、運動ニューロンの機能障害と変性に関与する分子の同定を試みた。その結果、我々は特に、ICV ASO 治療マウス群において、栄養効果分子である *Gipr1*、*Fgf2*、*Emr1* などの著明な発現上昇を新規に見出しており、これらが重要な (ASO) 標的分子である可能性が示された。今後これら分子の、SBMA におけるニューロン変性関与のメカニズムの解明を進めていくと同時に、分子治療標的としての機能解析を行う予定である。

#### 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 2 件)

(1) 佐橋健太郎、祖父江元. 変異タンパク質凝集体への治療的アプローチ. 生体の科学. 67 巻: p296-302, 2016. 査読無. doi: 10.11477/mf.2425200457

(2) 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. Vol. 24: p5985-94, 2015. 査読有. doi: 10.1093/hmg/ddv300.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 佐橋健太郎, 近藤直英, 中辻秀朗, 藤内玄規, 飯田円, 勝野雅央, 祖父江元. Dissection of mechanisms of neuronal degeneration in polyglutamine disease, ポスター, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016 年 5 月 18~21 日, 神戸コンベンションセン

ター (兵庫県神戸市)

(2) 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 年 11 月 26~28 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

(3) 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 年 5 月 20~23 日, 新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

(4) 佐橋健太郎, 勝野雅央, Gene Hung, 足立弘明, 近藤直英, 飯田円, 中辻秀朗, 宮崎雄, 藤内玄規, C. Frank Bennett, 祖父江元. アンチセンス核酸を用いた球脊髄性筋萎縮症の病態治療研究, 口演, 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014 年 5 月 21~24 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

[その他]

名古屋大学大学院医学系研究科・医学部医学科・神経内科学ホームページ  
[https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical\\_J/laboratory/clinical-med/clinical-neurosciences/neurology/](https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/clinical-med/clinical-neurosciences/neurology/)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

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

##### (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

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

##### (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

##### (4) 研究協力者

C. Frank Bennett  
Senior Vice President, Ionis Pharmaceuticals