

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15337

研究課題名(和文)シスタチンCを標的とした孤発性ALSのバイオマーカー開発と治療法開発

研究課題名(英文)Development of biomarker and therapy for amyotrophic lateral sclerosis targeting cystatin C

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：孤発性ALS患者における血清シスタチンC値を横断的・縦断的に解析し、血清シスタチンC値が孤発性ALSの病勢評価及び予後予測に寄与するか否かについて、健常人及び球脊髄性筋萎縮症(SBMA)患者を対照として検証した。初回評価時のALS群の平均血清シスタチンC値は、健常人群およびSBMA群と比較して有意に高値であった。また、血清シスタチンC値と重症度については、初回評価時におけるALS群の血清シスタチンC値とALSFRS-Rが有意に相関することが明らかとなった。さらに初回評価時の血清シスタチンC値と24週後の%FVCおよびDXA法における筋量マーカーであるALSTmassの変化量が有意に相関した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the serum levels of cystatin C in the subjects with sporadic ALS, both cross-sectionally and longitudinally, to clarify whether serum cystatin C is a potential biomarker reflecting the severity of motor dysfunction and predicting prognosis of this disease. The results were compared with those with healthy controls (HC) and spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). Baseline levels of serum cystatin C in the subjects with ALS were significantly higher than those of HC and SBMA. As for the relationship between disease severity, a strong correlation was found between baseline levels of serum cystatin C and ALSFRS-R in the subjects with ALS. Furthermore, baseline levels of serum cystatin C were correlated with the 24-week change of %FVC and that of appendicular lean soft tissue mass, as an index of skeletal muscle mass, in ALS. In conclusion, serum cystatin C may be a potential biomarker which reflects the disease progression of ALS.

研究分野：神経内科

キーワード：運動ニューロン疾患 シスタチンC バイオマーカー 筋萎縮性側索硬化症

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は、上位および下位運動ニューロンの選択的変性により進行性の筋萎縮・筋力低下をきたす運動ニューロン疾患である。進行が速く、人工呼吸器を装着しなければ、多くの例が発症後3年から5年で呼吸筋麻痺により死亡する。近年、TDP-43 や C9orf72 など、孤発性および家族性 ALS の発症に寄与すると考えられる分子が同定されてきているが、治療法の開発は難航しており、riluzole 以外の承認薬がない状況が長く続いている。ALS に対する治療法開発が難航している原因の一つに、治療のターゲットとすべき分子が十分同定されておらず、病勢や薬効を鋭敏に反映するバイオマーカーが未確立であることが挙げられる。

孤発性 ALS 患者の運動ニューロン細胞内には幾つかの特徴的な病理学的所見がみられるが、なかでもプリオン小体は ALS に特異的に認められる細胞質内異常構造物であり、シスタチン C に対する抗体で明瞭に染色されることが知られている。シスタチン C はシステインプロテアーゼ阻害物質で、細胞外のシステインプロテアーゼ活性を調節することにより神経保護的に機能すると考えられている。申請者の予備的検討において孤発性 ALS 患者における血清シスタチン C 値が、健康人に比して高値であり、かつ患者の運動機能と負の相関があることが示されている。そこで、孤発性 ALS における血清シスタチン C のバイオマーカーとしての妥当性を検討するとともに、治療標的としての可能性について検討することを目的とし本研究を立案した。

2. 研究の目的

血清シスタチン C の ALS の血清学的バイオマーカーとしての妥当性を横断的・縦断的に検証するとともに、患者 iPS 由来運動ニューロンを用いて神経変性に対するシスタチン C の効果を明らかにし、シスタチン C をターゲットとした治療法の開発を進める。

3. 研究の方法

血清シスタチン C 値を ALS 患者群と健常コントロール群、他の運動ニューロン疾患の代表である球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) 患者群とで比較し、ALS に特異的なバイオマーカーであるか否かを明らかにした。年齢、性別、罹病期間、発症時年齢などの背景項目の解析に加え、運動機能の評価として ALS 疾患特異的運動機能尺度である ALSFRS-R (ALS Functional Rating Scale-Revised)、握力、舌圧、および呼吸機能検査における努力性肺活量 (%FVC) を測定・解析した。また、全身の筋肉量を評価するため、dual X-ray absorption

(DXA) による lean mass の測定を行ない、その数値から四肢の筋肉量の推定値である appendicular lean soft tissue (ALST) mass を算出した。

また、縦断的検討として、初回評価から 24 週後に同様の評価を行ない、0 週時と 24 週時にシスタチン C 値を含む血液検査、ALSFRS-R などの運動機能スコア、握力、舌圧、呼吸機能検査などの定量的臨床データ、放射線検査を縦断的に評価し、血清シスタチン C 値が ALS の重症度や進行速度を予測するバイオマーカーであるか明らかにした。

4. 研究成果

(1) ALS 患者における血清シスタチン C の特異性

健常コントロール群 25 名 (全て男性)、SBMA 患者群 65 名 (全て男性)、ALS 患者群 46 名 (男性 34 名、女性 12 名) を対象とし、血清シスタチン C 値を比較した。評価時の年齢はそれぞれ 55.9±11.7 (平均±標準偏差、以下同様) 歳、54.1±9.9 歳、63.0±9.5 歳であった。血清シスタチン C 値はそれぞれ 0.84±0.12 mg/l、0.85±0.16 mg/l、1.02±0.27 mg/l であり、ALS 群では他 2 群と比較して有意に高かった (図 1)。また、年齢による補正を行ったがその有意性は保たれた。

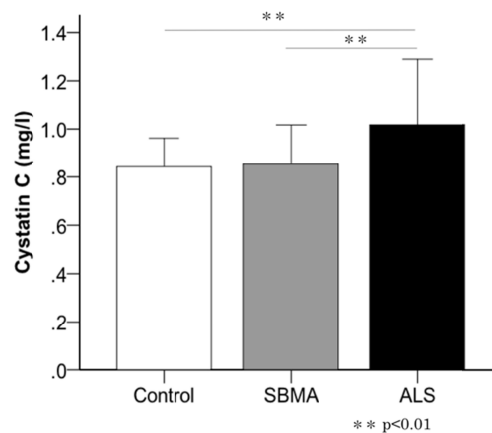


図1. 各群の血清シスタチンC値(0週時)

さらに0週時と24週時に評価できた健常コントロール群 15 名、SBMA 患者群 31 名、ALS 患者群 21 名 (男性 18 名、女性 3 名) において検討した。年齢はそれぞれ 58.9±8.4 歳、55.5±10.1 歳、65.0±9.7 歳であり、有意差を認めなかった。各観察時の血清シスタチン C 値はそれぞれ、0 週時ではコントロール、0.83±0.12 mg/l; SBMA, 0.91±0.14 mg/l; ALS, 0.98±0.21 mg/l、24 週時ではコントロール、0.86±0.11 mg/l; SBMA, 0.92±0.13 mg/l; ALS, 1.04±0.22 mg/l であった。24 週間の観察期間における血清シスタチン C 値の変化量は、コントロール、0.021±0.057 mg/l; SBMA, 0.009±0.072 mg/l; ALS, 0.056±0.021 mg/l であり、各群間に有意差はなく各群で上昇する傾

向があったが、ALS 群にて血清シスタチン C 値はより上昇する傾向にあった(図 2)。

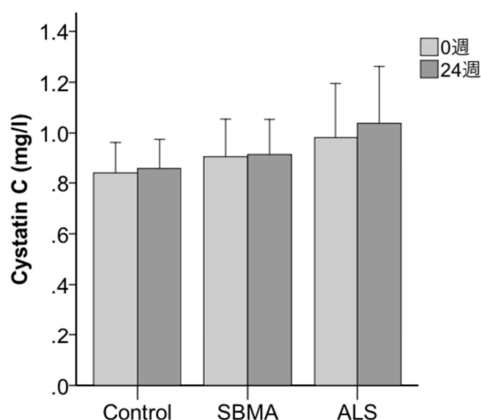


図2. 各群の血清シスタチンC値 (0週時と24週時の比較)

(2)血清シスタチン C 値と重症度の検討

ALS 患者 21 名と SBMA 患者 31 名の 0 週時の血清シスタチン C 値と運動機能スケールの ALSFRS-R との相関を検討した。ALSFRS-R は ALS 群で 39.5 ± 5.2 、SBMA 群で 40.3 ± 4.0 であった。ALS 群では血清シスタチン C 値が高いほど ALSFRS-R が低く、重症であるが SBMA 群では同様の相関は認められなかった (ALS 群 $r = -0.445$ $p = 0.043$ 、SBMA 群 $r = 0.052$ $p = 0.781$ 、図 3)。

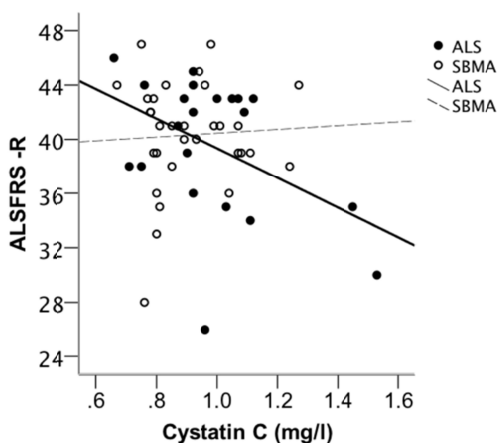


図3. ALSとSBMAにおける血清シスタチンC値とALSFRS-Rの関係

(3)血清シスタチン C 値による予後予測

ALS 患者群 21 例において、ALSFRS-R、Limb-Norris scale、Norris-Bulbar scale の 3 つの運動スケールに関して、それらの悪化と 0 週時のシスタチン C 値の有意な相関関係は認められなかった。

次に、定量的評価項目である握力、舌圧、努力性肺活量(FVC)、および、筋肉量の指標として Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA 法) による体肢除脂肪組織量(ALST mass)の 24 週での変化量と血清シスタチン C 値との相関関係を検討したところ、血清シ

スタチン C 値が高い程、24 週後に %FVC、ALST mass が低下した ($\Delta\%FVC$ 平均 $-16.2 \pm 17.7\%$ 、 $r = -0.442$ 、 $p = 0.045$; $\Delta ALST$ mass 平均 $-1414.3 \pm 1292.2g$ 、 $r = -0.469$ 、 $p = 0.032$ 、図 4 A,B)。つまり、0 週時の血清シスタチン C 値が高いほど、24 週後の呼吸機能と筋肉量が低下していることが予測される。

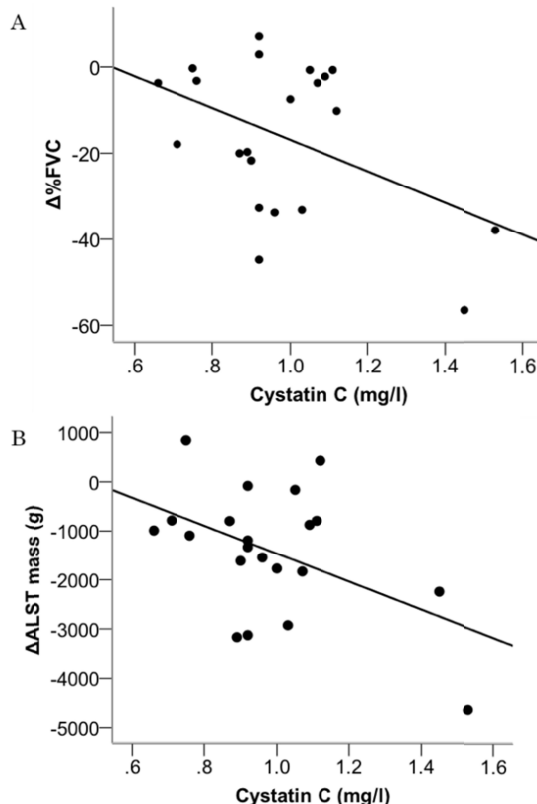


図4 A. %FVCの24週での変化と0週時血清シスタチンC値の関係. B. ALSTの24週での変化と0週時の血清シスタチンC値の関係

一方、24 週での血清シスタチン C 値の変化量と各臨床指標との相関関係を検討したが、有意な相関を認める指標はなかった。

血清シスタチン C 値が他の血清マーカーに比べ、上述の $\Delta\%FVC$ と $\Delta ALST$ mass を予測できるか重回帰分析を行った。血清マーカーはシスタチン C の他にクレアチニン、CK、AST、ALT、総ビリルビン、総タンパク、アルブミン、LDL、HDL、HbA1c を使用した。ステップワイズ法にて選択したところ、 $\Delta\%FVC$ については、シスタチン C が予測因子として残った。

以上の解析結果から、血清シスタチン C 値は ALS の発症、進行の病態に関わる疾患特異的バイオマーカーである可能性が示唆された。シスタチン C はカテプシン B, S, F の阻害剤であり、その生理的機能は十分明らかになっていないが、神経保護作用を有することが基礎研究において示されている。シスタチン C の過剰発現はアルツハイマー病やパーキンソン病の細胞モデルにおいて神経変性を抑制することが報告されており、

ALS のモデルマウスである変異 SOD1 マウスにおいてもカテプシン B の阻害を介して運動ニューロン変性を抑制することが示されている (Watanabe et al. *Cell Death Dis.* 2014)。

一方、シスタチン C のバイオマーカーとしての有用性については ALS 患者を対象とした臨床研究が散見され、髄液中レベルと予後との相関が示唆されている (Wilson et al. *PLoS One* 2010)。また、本研究と同様血清シスタチン C が重症度と正の相関を示すことが報告されているが、本研究ではさらに、呼吸機能や筋肉量との関連を明らかにすることができたと考えられる (Ren et al. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015)。

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 6 件)

1. Watanabe H, Atsuta N, Hirakawa A, Nakamura R, Nakatochi M, Ishigaki S, Iida A, Ikegawa S, Kubo M, Yokoi D, Watanabe H, Ito M, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Kanai K, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Kawata A, Aoki M, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G. A rapid functional decline type of amyotrophic lateral sclerosis is linked to low expression of TTN. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [Epub ahead of print] doi: 10.1136/jnnp-2015-311541. 査読有
2. Nakamura R, Sone J, Atsuta N, Tohnai G, Watanabe H, Yokoi D, Nakatochi M, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Tanaka F, Li Y, Izumi Y, Morita M, Taniguchi A, Kano O, Oda M, Kuwabara S, Abe K, Aiba I, Okamoto K, Mizoguchi K, Hasegawa K, Aoki M, Hattori N, Tsuji S, Nakashima K, Kaji R, Sobue G; Japanese Consortium for Amyotrophic Lateral Sclerosis Research (JaCALS). Next-generation sequencing of 28 ALS-related genes in a Japanese ALS cohort. *Neurobiol Aging*. [Epub ahead of print]doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.030. 査読有
3. Watanabe H, Atsuta N, Nakamura R, Hirakawa A, Watanabe H, Ito M, Senda J, Katsuno M, Izumi Y, Morita M, Tomiyama H, Taniguchi A, Aiba I, Abe K, Mizoguchi K, Oda M, Kano O, Okamoto K, Kuwabara S, Hasegawa K, Imai T, Aoki M, Tsuji S, Nakano I, Kaji R, Sobue G. Factors affecting longitudinal functional decline and survival in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.* 16(3-4): 230-236, 2015. doi: 10.3109/21678421.2014.990036. 査読有
4. Nagahara Y, Shimazawa M, Tanaka H, Ono Y, Noda Y, Ohuchi K, Tsuruma K, Katsuno M, Sobue G, Hara H. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B ameliorates skeletal muscle lesions in a SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res.* 93(10): 1552-1566, 2015. doi: 10.1002/jnr.23619. 査読有
5. 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/D/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat Commun.* 6:7098, 2015. doi: 10.1038/ncomms8098. 査読有
6. 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. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.005. 査読有

[学会発表](計 11 件)

1. Yasuhiro Hijikata, Masahisa Katsuno, Atsushi Hashizume, Shinichiro Yamada, Tomonori Inagaki, Keisuke Suzuki, Haruhiko Banno, Gen Sobue. Disrupted muscle uptake of creatine in spinal and bulbar muscular atrophy. The 26th International Symposium on ALS/MND, 2015.12.11-13, Orlando, USA, ポスター
2. Atsushi Hashizume, Masahisa Katsuno, Keisuke Suzuki, Haruhiko Banno, Noriaki Suga, Tomoo Mano, Amane Araki, Yasuhiro Hijikata, Christopher Grunseich, Angela Kokkinis, Akihiro Hirakawa, Hirohisa Watanabe, Masahiko Yamamoto, Kenneth H. Fischbeck, and Gen Sobue. A functional scale for spinal and bulbar muscular atrophy: Cross-sectional and longitudinal study. The 26th International Symposium on ALS/MND, 2015.12.11-13, Orlando, USA, ポスター
3. Katsuno M, Adachi H, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Nakatsuji H, Tohnai G, Sobue G. Cell cycle inhibitor ameliorates motor neuron degeneration induced by polyglutamine-expanded androgen receptor. The 26th International Symposium on ALS/MND, 2015.12.11-13, Orlando, USA, ポスター
4. 土方靖浩、勝野雅央、橋詰淳、山田晋一郎、稲垣智則、鈴木啓介、坂野晴彦、祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症における骨格筋クレアチン取り込み異常. 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）、口演
5. 勝野雅央, 足立弘明, 近藤直英, 飯田 円, 中辻 秀朗, 藤内 玄規, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症に対する flavopiridol の効果. 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）、ポスター
 6. Sahashi K, Katsuno M, Hung G, Adachi H, Kondo N, Nakatsuji H, Tohnai G, Iida M, Bennett CF, Sobue G. Intracerebroventricular administration of antisense oligonucleotides improves disease phenotypes in SBMA mice. 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）、口演
 7. Kondo N, Katsuno M, Adachi H, Sahashi K, Iida M, Nakatsuji H, Tohnai G, Sobue G. Epigenetic treatment of polyglutamine-induced motor neuron disease.. 第 56 回日本神経学会学術大会, 2015.5.20-23, 新潟, ポスター
 8. Iida M, Katsuno M, Nakatsuji H, Adachi H, Kondo N, Miyazaki Y, Tohnai G, Watanabe H, Yamamoto M, Kishida K, Sobue G. The effects of pioglitazone on spinal and bulbar muscular atrophy. 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）、ポスター
 9. Yasuhiro Hijikata, Masahisa Katsuno, Keisuke Suzuki, Haruhiko Banno, Atsushi Hashizume, Shinichiro Yamada, and Gen Sobue. Impaired muscular creatine metabolism in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). 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）、ポスター
 10. Katsuno M, Adachi H, Sahashi K, Kondo N, Iida M, Nakatsuji H, Tohnai G, Sobue G. Inhibition of TGF-beta signaling induces cell-specific neurodegeneration. 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）、ポスター
 11. 山田晋一郎, 勝野雅央, 鈴木啓介, 橋詰 淳, 土方靖浩, 祖父江元. 球脊髄性筋萎縮症患者における呼吸機能 - 筋萎縮性側索硬化症との比較. 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）、ポスター

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

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

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：20725529

(3)連携研究者

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

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