

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08760

研究課題名(和文) 家族性筋萎縮性側索硬化症に対するグルコースアナログ剤による病変進行抑制機構の解明

研究課題名(英文) Inhibitory mechanisms of ALS progression with glucose analogue administration

研究代表者

加藤 雅子 (KATO, Masako)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80221183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はグルコースアナログの筋萎縮性側索硬化症(ALS)への効果を明らかにすることである。グルコースアナログを投与したALSマウスにおいて、プラセボ投与ALSマウスと比較して、生存期間、病期期間の有意な延長がみられた。グルコースアナログを投与したALSマウスでは、プラセボ投与ALSマウスと比較して、脊髄前角細胞が有意に残存していた。グルコースアナログの経口投与は、臨床症状のみならず病理組織学的所見からもALSの進行を抑制していた。本研究によりグルコースアナログはALSの新規治療薬候補として有望であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ALSは神経難病の1つである。上位および下位運動ニューロンが変性、消失し、最終的には呼吸筋麻痺にて死に至る。治療は対症療法が主体で、新規の治療薬開発が希求されている。現在ヒトにおいて、グルタミン酸受容体の拮抗薬としてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールと急性脳梗塞の治療剤であるエダラボンが承認されている。しかし、その効果は病初期の症例において認められるのみで、限定的と言わざるをえない。かかる状況において、グルコースアナログ投与がALSモデルマウスにおいて顕著なALS進行抑制効果を示した。しかも経口投与が可能なのは、ALSの新規治療薬候補として患者、医療福祉の面において貢献は大である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is demonstrating efficacy of glucose analogues for ALS. The survival duration and the disease duration in the glucose analogue-administered ALS mice was significantly extended than in the placebo-administered ALS mice. The number of residual motor neurons of the spinal anterior horn of the glucose analogue-administered ALS mice was greater than that of the placebo-administered ALS mice at early symptomatic stage histopathologically. Orally glucose analogue-administration to the ALS mice delayed the progression of the clinical symptoms as well as the neuropathological findings. These results suggest a possibility of glucose analogue as a new therapeutic candidate for ALS.

研究分野：病理学

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 グルコースアナログ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

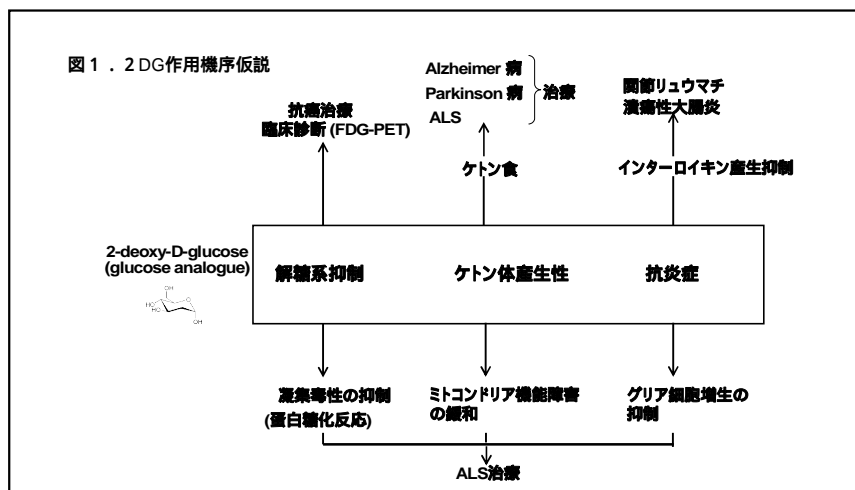
1. 研究開始当初の背景

Amyotrophic lateral sclerosis(ALS)は神経難病の1つである。上位および下位運動ニューロンが変性、消失し、患者は最終的には呼吸筋麻痺にて死に至る。1869年にJean-Martin CharcotとAlexis Joffroyがこの疾患を報告して以来約150年が経過したが、その有効な治療法は確立していない。ALSの中の5-10%はfamilial ALS(FALS)が占める。FALSの原因遺伝子にSOD1 mutationが最初に発見された。その後、ヒト変異SOD1を導入したモデル動物が開発され、広く研究に用いられている。これらのモデルマウスを用いて、ALSの治療薬としてこれまで神経栄養因子、神経保護因子、caspase 抑制剤、銅キレート剤、グルタミン酸抑制剤などの種々の化合物のALS治療効果について検討がなされてきた。しかしながら、ヒトにおいて、ALS治療薬として承認されているのは、グルタミン酸受容体の拮抗薬としてグルタミン酸抑制作用のあるリルゾールである。更に、抗酸化作用を有する急性脳梗塞の治療剤であるエダラボンが本邦では承認されている。リルゾールは内服薬であるが、エダラボンは注射薬であり、いずれも高価である。しかもその効果はALSの病初期の症例において認められるのみで、限定的と言わざるを得ない。そのため有効な新規治療薬の開発が希求されている。

グルコースアナログ(GA)は癌の治療やてんかんの治療目的に研究が行われてきた。また、2次的にketogenesisを促進することから、Alzheimer diseaseやParkinson diseaseの治療にも応用されてきた。さらに、関節リウマチに対する抗炎症作用も報告されてきている。このようにGAの作用機序は多様であることが判明してきた(図1)。

2. 研究の目的

ALSの病因については種々の仮説が提唱されているが、現在尚不明である。発症後の細胞死に寄与する病態生理学的機序には、ミトコンドリア機能異常、タンパク質凝集、フリー-ラジカルの生成、興奮毒性、アポトーシス、ER stress等が含まれる。更に、炎症説もALS病態病因の1つである(図1)。この仮説はneuron-astrocyte-microglia 連関においてmotor neuron死が惹起されると考えられている。GAは、ミクログリアの増生を抑え、炎症を抑制することが報告されている。このため、GAは炎症を抑制し、motor neuron deathの抑制につながる可能性が示唆される。我々は、予備実験において、このGAがALSに有効であることを見出した。本研究は、ALS-SOD1モデルマウスにGAを連日経口投与することによるGAのALS症状の進行抑制効果を確認することである。神経難病の象徴であるALSに対するGA剤による新規治療薬の開発への道を開くことである。



3. 研究の方法

(1) 実験動物

LSモデルマウスとして、ヒト変異SOD1遺伝子を導入したALS-SODマウスを使用した。これらの野生型同腹仔マウスと正常マウスを対照群として用いた。

(2) 化合物投与方法

ヒト変異SOD1遺伝子を導入したALSマウスは、生後100日の後肢筋力低下を確認した時点から、GA投与群には、GA 1mg/マウス体重gを1日1回、胃ゾンデを用いて直接投与した。プラセボ投与群には、同時期よりマウス用飲料水をGA投与群と体重当たり等量投与した。

(3) 人道的終末期までの観察実験

ALS-SODマウスをGA投与群とプラセボ投与群の2群に分け、人道的終末期まで、経過観察を行い、生存期間、病悩期間、臨床病期を化合物投与群とプラセボ投与群間で比較検討した。終末期において脊髄の病理組織学的検索を行った。

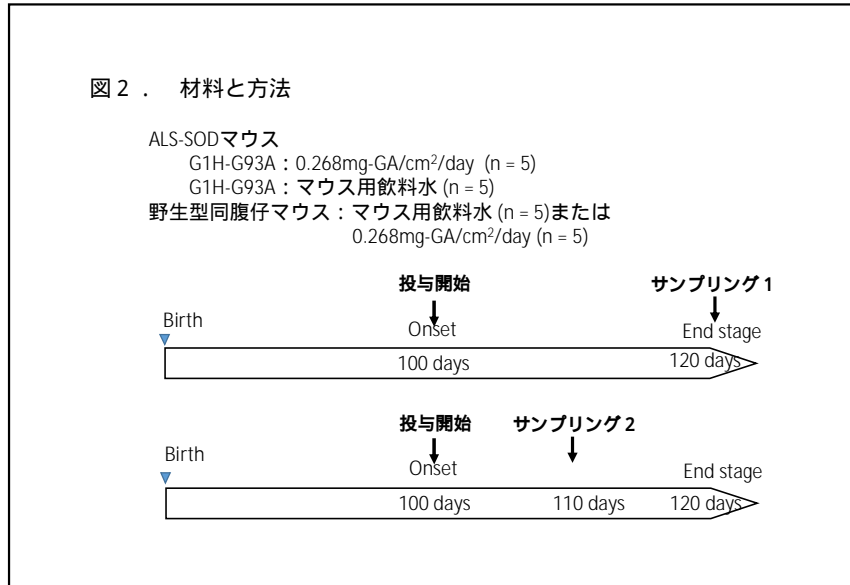
(4) 発症早期までの観察実験

第2の実験系として、ヒト変異 SOD1 遺伝子を導入した ALS-SOD マウスを GA 投与群とプラセボ投与群の2群に分け、神経症状の発症を確認した後、投与を開始し、発症早期までの経過観察を行った。この発症早期の時点で、病期の判定と組織サンプリングを行い、病理組織学的検索を行った。脊髄前角の病理組織像、運動ニューロン数と封入体数等を検討した。

(5) GA の種類による ALS 進行抑制効果の検討

GA3 剤 (GA-1, 2, 3) において上記と同様の実験系における有効性、副作用につき検討する。

本研究は、鳥取大学動物実験委員会の承認と遺伝子組換え実験委員会の承認を得て実施した。



4. 研究成果

GA 投与群では、プラセボ投与群に比べて ALS-SOD マウスの生存期間、病悩期間の有意な延長を示した。また、病期の延長を示し、ALS の進行抑制効果を示した。これは、すでに治療薬として承認されている riluzole と比較しても有意な生存期間、病悩期間の延長が明らかであった。また、有害な行動、症状は確認されなかった。人道的終末期における病理組織学的解析では、GA 投与群とプラセボ投与群の脊髄前角運動神経細胞数は正常コントロールである野生型同腹仔と比較して著明に減少していた (図 3A, B)。GA 投与群とプラセボ投与群の間に脊髄前角運動神経細胞数の有意な差は認められなかった。内臓諸臓器に病理組織学的に有害な副作用を示唆する所見は認められなかった。

発症早期における病理組織学的解析では、GA 投与群では、プラセボ投与群に比べて神経細胞の有意な残存を認めた (図 3C, D)。胞体内やニューロピル内の Lewy 小体様硝子様封入体の形成は、GA 投与群ではプラセボ投与群に比べて有意に抑制されていた (図 3C, D)。

GA 間の比較では、GA1 の ALS 進行抑制効果が最も大きかったが、GA2 は、病期 5 を延長する効果が認められた。

Lewy 小体様硝子様封入体は glycation を受けた SOD1 をはじめとする蛋白質の凝集体である [Kato S. (3 番目), Science, 1998, Kato S. et al., Acta Neuropathol., 2000]。糖化反応を受けた最終糖化産物は、不溶性で、一般的に細胞毒性を示す。Lewy 小体様硝子様封入体の形成を抑制したことは、glycation を受けた最終糖化産物の産生を抑制することに繋がる。つまり、凝集毒性を減少させることによって神経細胞死を抑制した可能性が示唆された。グルコースアナログの従来剤のリルゾールやエダラポンとは作用機序とは全く異なる ALS 新規治療薬としての可能性が示された。また、従来剤とは作用機序が異なるため、これらの薬剤との併用も可能であると考えられる。

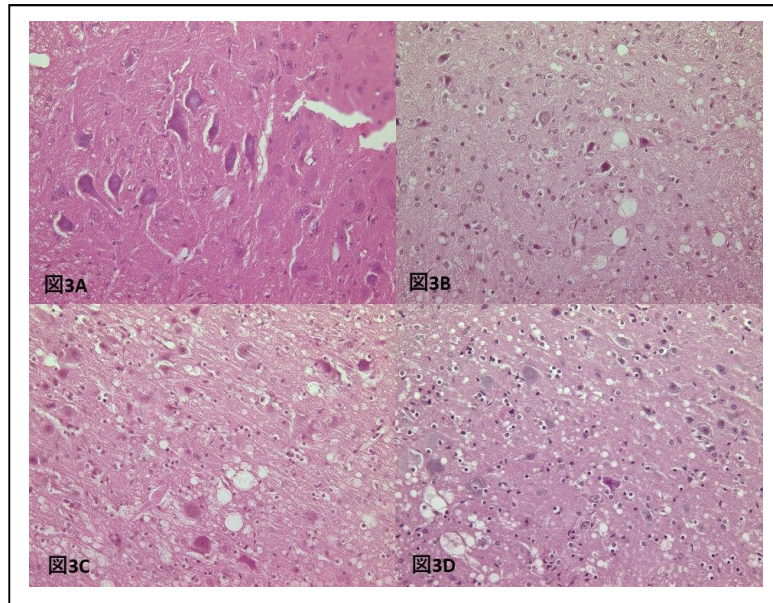


図3 . マウス脊髄前角病理組織像（ヘマトキシリン・エオシン染色、対物レンズ×20）

<引用文献>

Bruijn L.I., Houseweart M.K., Kato S., Anderson K.L., Anderson S.D., Ohama E., Reame A.G., Scott R.W. and Cleveland D.W. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science* 281: 1851-2854, 1998.

Kato S., Horiuchi S., Liu, J., Cleveland D.W., Shibata N., Nakashima K., Nagai R., Hirano A., Takikawa M., Kato M., Nakano I. and Ohama E. Advanced glycation endproduct-modified superoxide dismutase-1 (SOD1)-positive inclusions are common to familial amyotrophic lateral sclerosis patients with SOD1 gene mutations and transgenic mice expressing human SOD1 with a G85R mutation. *Acta Neuropathol.* 100, 490-505, 2000.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤雅子、加藤信介、林 一彦、加藤聖大
2. 発表標題 グルコースアナログの筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの進行抑制効果の検討
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤雅子、林 一彦、加藤信介、加藤聖大、内藤善哉、桑本聡史
2. 発表標題 2-デオキシ-D-グルコース経口投与は、ALSマウスの発症早期における脊髄の病理像の進行を抑制する
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤雅子、林 一彦、加藤信介、内藤善哉、桑本聡史
2. 発表標題 2グルコースアナログ経口投与は筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの生存を延長する
3. 学会等名 107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato M, Kato S, Hayashi K, Kato K, Wardhani L
2. 発表標題 The expression of CD3, oxidative cytotoxic molecule, and stress response proteins related to degeneration of Purkinje cells in multiple system atrophy, cerebellar type
3. 学会等名 ICN2018: 19th International Neuropathology of Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤 雅子、林 一彦、加藤 信介、桑本 聡史
2. 発表標題 ALSモデル動物の細胞障害からの肝細胞回復過程の経時的形態変化：脊髄前角細胞との比較
3. 学会等名 第106回日本病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤雅子、加藤信介、林 一彦
2. 発表標題 系統萎縮症(MSA-C)小脳ブルキンエ細胞変性過程のCD3・酸化ストレス指標・ストレス応答蛋白による免疫組織化学的検討
3. 学会等名 第58回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 信介 (KATO Shinsuke) (60194817)	鳥取大学・医学部・准教授 (15101)	
研究分担者	桑本 聡史 (KUWAMOTO Satoshi) (60567189)	鳥取大学・医学部・講師 (15101)	
連携研究者	山岸 大輔 (YAMAGISHI Daisuke) (80541672)	鳥取大学・産学・地域連携推進機構・准教授 (15101)	