

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09747

研究課題名（和文）孤発性筋萎縮性側索硬化症治療薬としての分子標的薬RNAアプタマーの研究

研究課題名（英文）The study of molecularly targeted drug RNA aptamer for treatments for sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

研究代表者

赤松 恵 (Akamatsu, Megumi)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：00753675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：孤発性筋萎縮性側索硬化症（ALS）では、AMPA受容体のサブユニットGluA2のQ/R編集部位が未編集なために生じるCaイオン透過性によって神経細胞内のCaイオン濃度が上昇することで神経変性や細胞死の原因となると考えられている。従って過剰なCaイオンの細胞への流入を抑えることが孤発性ALSの治療戦略となる。本研究では、AMPA受容体を選択的に阻害する分子標的薬RNAアプタマーをALSモデルマウス（AR2）に投与し、その効果と安全性を検討した。結果、運動機能の改善、TDP-43病理の改善、運動神経細胞死の抑制が確認され、RNAアプタマーのALS治療薬としての可能性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、現在までに有効な治療方法がなく、効果的で安全な治療法が早期に期待される神経変性疾患である。近年では神経保護的な薬剤や核酸医薬などの遺伝子治療なども多く検討されている。本研究では未編集型AMPA受容体における異常なカルシウムイオン流入による神経細胞死を抑制することに注目している。RNAアプタマーはAMPA受容体のサブユニット特異性が高いことより、他のAMPA受容体阻害薬に比べて、副作用として生じる鎮静効果も少ないことから安全性も高いと思われる。またALS以外にもてんかんや一部の認知症などにも応用が可能な治療法であることから、社会的意義は高いものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In motor neurons of sporadic amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients, the RNA editing at the glutamine/arginine site of the GluA2 subunit of AMPA receptors is defective or incomplete. As a result, AMPA receptors containing the abnormally expressed unedited isoform of GluA2 are highly Ca<sup>2+</sup> permeable, thereby triggering motor neuron degeneration and cell death. Thus, blocking abnormal Ca<sup>2+</sup> influx is a potential therapeutic strategy for treatment of sporadic ALS. In this study, I evaluated the efficacy and safety of three RNA aptamers targeting AMPA receptors on the ALS phenotype of ALS model mice (AR2 mice). A 12-week continuous, intracerebroventricular administration of aptamers to AR2 mice reduced the progression of motor dysfunction, improved TDP-43 mislocalization, and prevented death of motor neurons. This results demonstrate that the use of AMPA receptor aptamers as a novel class of AMPA receptor antagonists is a promising strategy for developing an ALS treatment approach.

研究分野：神経科学

キーワード：ALS治療薬 RNAアプタマー ALSモデル カルシウム透過性 運動ニューロン ADAR2

## 1. 研究開始当初の背景

研究分担者らは、これまでに孤発性 ALS の脊髄運動ニューロンで AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を決定するサブユニット GluA2 に、本来行われるべき RNA 編集の効率が低下し (Kawahara ら *Nature* 2004; Hideyama ら *Neurobiol Dis* 2012)、AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を亢進させる分子変化が生じていることを明らかにした。GluA2 グルタミン・アルギニン (Q/R) 部位の RNA 編集は、アデノシンをイノシンに変換する RNA 編集 (A-to-I RNA editing) に関わる酵素 adenosine deaminase acting on RNA 2 (ADAR2) により特異的に触媒される。ALS の脊髄運動ニューロンでは ADAR2 の発現レベルも著明に低下していること (Hideyama ら *Neurobiol Dis* 2012)、ADAR2 活性が低下・消失することにより運動ニューロンにおける GluA2 の RNA 編集が行われず、緩徐な運動ニューロン死がおこること、それが AMPA 受容体からの  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の亢進により細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$ 流入が増加することによることを、コンディショナル ADAR2 ノックアウトマウスの開発・解析から明らかにした (Hideyama ら, *J Neurosci* 2010)。さらに、異常な未編集型 GluA2 を含む  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の発現により、ALS に特異的な TDP-43 病理が神経細胞内に引き起こされるが (Yamashita ら, *Nat Commun* 2012)、GluA2 Q/R 部位の RNA 編集の正常化により TDP-43 の細胞内の局在が正常化し、さらに運動ニューロン死も阻止されることを示した (Yamashita ら, *EMBO Mol Med* 2013)。

一方、RNA アプタマーはタンパク質などの標的分子に高い特異性および親和性で強く結合する RNA 分子で、標的分子の機能を特異的に修飾する事が可能であり生物学的反応性が低いため、抗体医薬に代わる次世代の分子標的医薬として期待されている。研究協力者の米国ニューヨーク州立大学 Albany 校、化学教室の Li Niu 教授は、正常には発現しない未編集型 GluA2 を含む AMPA 受容体のみをブロックする RNA アプタマーを作製した (Park ら, *J Biol Chem* 286:15608-17, 2011)。この RNA アプタマーの特性から、未編集型 GluA2 の発現が病的意義を持つ孤発性 ALS の新たな治療法として期待される。

## 2. 研究の目的

孤発性筋萎縮性側索硬化症 (ALS) でみられる運動ニューロン死には RNA 編集活性の低下によって生じる未編集型 GluA2 をサブユニットに持つ異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体の発現が深く関与している可能性が高い。そのため、AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を正常化することは、運動ニューロン死に抑制つながることから治療戦略になると考えた。従来 of AMPA 受容体拮抗薬は臨床応用が困難であったが、異常な  $\text{Ca}^{2+}$ 受容体 AMPA 受容体のみを阻害することができれば、生理的な AMPA 受容体の機能を保ちつつ ALS の運動ニューロン死の抑制が可能で、臨床応用性も高いと考えられる。本研究では未編集型 GluA2 をサブユニットに持つ AMPA 受容体を特異的にブロックする RNA アプタマーの効果をモデルマウスで評価し、治療法の可能性を探る。

## 3. 研究の方法

$\text{Ca}^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体を選択的にブロックする RNA アプタマーを孤発性 ALS の分子病態モデルであるコンディショナル ADAR2 ノックアウトマウス (AR2) に投与し、 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性 AMPA 受容体を介し

た運動ニューロン死の抑制効果、正常なニューロンの機能に及ぼす影響を評価する。RNA アプタマーの投与方法は、脳室内カニューレと浸透圧ポンプを用いてマウス脳室内に持続的に直接注入する。また、放射性同位体標識した RNA アプタマーを用い脳脊髄内の分布と安定性を確認後、AR2 マウスへの投与により、運動機能へ及ぼす影響、組織における運動ニューロン死・TDP-43 の局在異常の抑制効果を評価し、治療法としての可能性を探求する。

1) ALS モデルマウス (AR2 マウス) への RNA アプタマー投与方法の確立

マウス定位脳固定装置を用いて脳室内注入用カニューレを頭蓋上に固定し、カニューレに接続されたカテーテルおよび浸透圧ポンプは皮下に埋蔵した。

2) 脳室内投与による RNA アプタマーの中樞神経系への分布の確認

RNA アプタマーを放射性同位体  $^{32}\text{P}$  で標識し、脳および脊髄の組織ホモジネートを液体シンチレーションカウンターで測定、電気泳動による組織内の安定性、組織切片を用いたラジオオートグラフィで灰白質への分布を確認した。

3) AR2 マウスの運動機能評価

ローターロッドの歩行時間および鎮静効果を立ち上がり回数と活動時間で評価した。

4) 運動神経細胞の病理学的評価

脊髄組織は免疫染色を行い、運動神経細胞数 (コリンアセチルトランスフェラーゼ抗体陽性細胞) および TDP-43 の細胞内局在を評価した。

4. 研究成果

AR2 マウスの頭蓋上に設置したカニューレを経て、浸透圧ポンプ内の RNA アプタマーを持続的また直接的に脳神経系組織へ到達させた (図 1a)。脊髄組織の垂直切片をラジオオートグラフィ (BAS-2500) で観察した結果では、投与 3 日目には、 $^{32}\text{P}$  標識 RNA アプタマーが脳から腰髄にまで到達し、脊髄神経の灰白質内に取り込まれているのが確認された (図 1b)。また、部位毎の組織ホモジナイズサンプルを、液体シンチレーションカウンターで計測した結果では、組織重量当たりの放射線量は図 1c の垂直切片での結果同様、脳での分布が多いもののアプタマーが腰髄ま

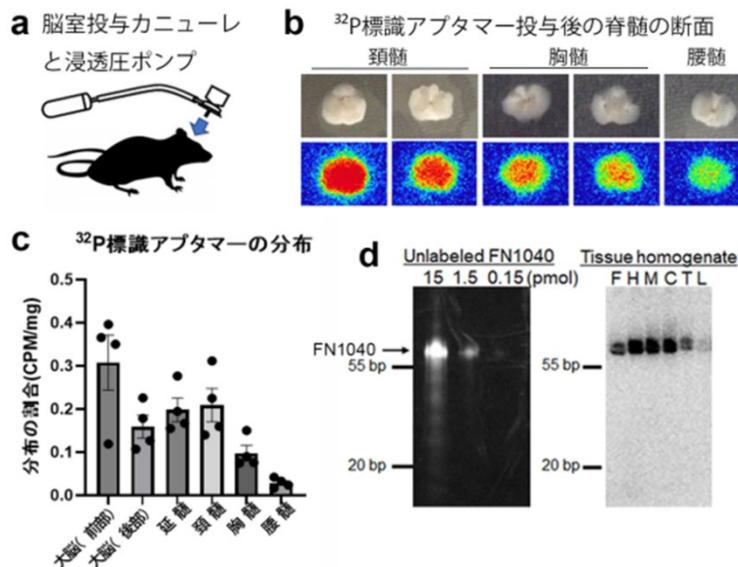


図 1. 脳室内投与による放射性同位体標識 RNA アプタマーの中樞神経系への分布の確認。a. 投与に用いたカニューレと浸透圧ポンプ。b. 脊髄垂直切片の  $^{32}\text{P}$  標識アプタマー灰白質内への分布。c. 各組織部位の放射線量 (n=4, mean  $\pm$  SEM)。d. 非標識アプタマー (FN1040) と、組織ホモジネートの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による組織内アプタマー

で到達したのが確認された (図 1c)。さらに、組織内でのアプタマーの安定性を確認するために、ホモジナイズしたサンプルを、

SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ったところ、非標識のアプタマーと同様の位置に <sup>32</sup>P 標識アプタマーが確認された (図 1d) ことから、側脳室から投与したアプタマーは脳脊髄液中および神経組織内でも分解されずに安定であることが確認された。

AMPA 受容体拮抗薬は、過剰な Ca<sup>2+</sup>イオンの神経細胞内への流入を抑えると同時に、その副作用として、鎮静効果が観察されることから、RNA アプタマー投与による鎮静効果の有無を確認するために、手術終了後 15、30、60 分、および 24 時間後に、それぞれ 3 分間内での立ち上がり回数と、移動 (歩行) 時間を計測した。

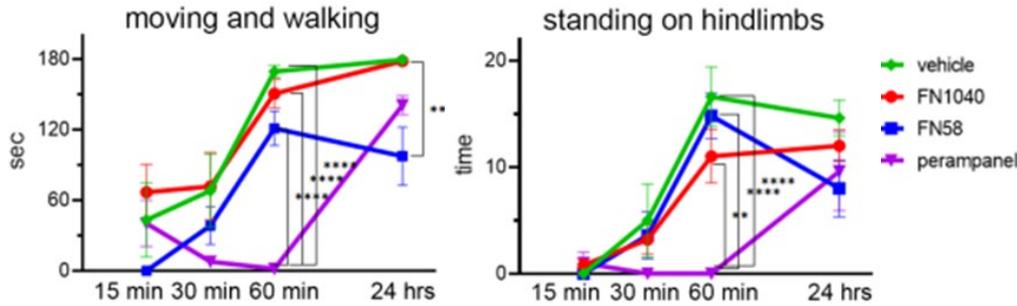


図 2. アプタマー投与による、鎮静効果. 移動および歩行時間 (左図)、立ち上がり回数 (右図). n=5. mean ± SEM. One-way ANOVA. \*\**P* < 0.01. \*\*\*\**P* < 0.0001

対照のペランパネルは非麻酔の経口投与であるが、経口投与後徐々にふらつきが観られ、30 分後には脱力と傾眠のためうずくまった状態になりほぼ活動が見ら

れなくなり、その状態は 60 分以上継続する。ペランパネルによる鎮静効果は 24 時間後にはほぼ正常に復帰する。一方、FN1040 投与群は、イソフルラン吸入麻酔から解放されたのち 15 分後には歩行可能、30 分後には後肢での立ち上がりも観られ、非投与群同様に鎮静効果は観られず、安全性も高いと考えられた (図 2)。しかしながら、FN58 投与群については、FN1040 投与群に比べやや回復が遅く、24 時間後も非投与群および FN1040 投与群に比べて移動・歩行時間は減少し、立ち上がり回数も少ない傾向がみられた。この結果より、後に行う長期投与では、FN58 投与群は、開始 3 日間

### ローターロッドから落下するまでの時間の変化

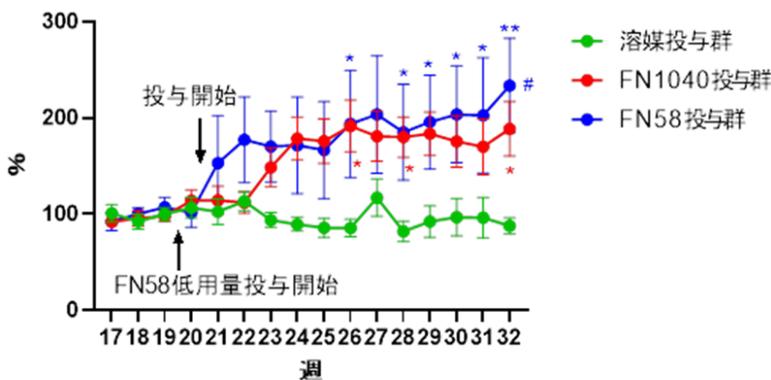


図 3. アプタマーの長期投与 (3 か月) による、AR2 マウスの運動機能の改善 (n=13, mean ± SEM, two-way ANOVA, \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs 非投与群, #*P* < 0.05 vs 投与開始).

運動機能が徐々に落ち始める時期 20 週齢を選択した。運動機能評価として、ローターロッド、体重の変化を観察し、投与終了後には深麻酔による安楽死をさせたのち頸髄組織を取り出し、脊髄前角の運動ニューロン数、ALS の病理である TDP-43 の細胞内局在について評価を行った。

用量での投与によって馴化させたのち 4 日目から目的用量での投与を行った。

2 週間の短期間アプタマー投与による、安全性と効果を確認したのちに、3 か月の長期投与を行った。長期投与では、2 種類の RNA アプタマー (FN1040, FN58) の評価を行い、対照として、溶媒のみを投与した溶媒投与群 (アプタマー非投与) を作成した。またアプタマーの投与開始時期として、もともとの AR マウスの運動

ローターロッドの結果では、溶媒投与群（アプタマー非投与）では、運動機能が徐々に低下したのに対し、アプタマー投与群は、低下が抑制されるだけでなく、投与2～3週間程度経過した頃から、徐々に落下までの時間が長くなり、非投与群に比べ、有意に運動機能が向上した（図3）。

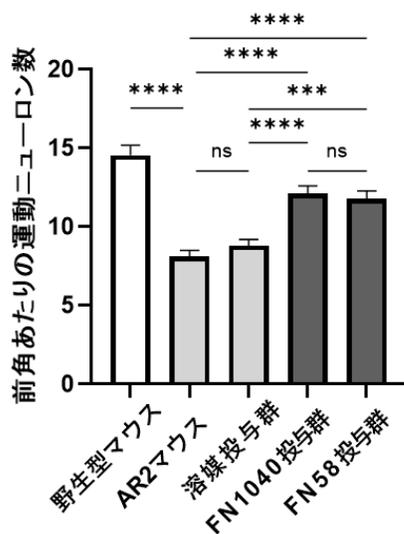


図4. アプタマー投与3か月後の脊髓前角運動ニューロン数の改善. 野生型に比べて、AR2マウスの脊髓前角の運動ニューロン数は約半数程度減少している. アプタマー投与により、運動ニューロン数は、AR2マウス（非投与群）、溶媒投与群に比べ、有意に増加した. (Mean ± SEM, Two-way ANOVA, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ )

次に、脊髓組織中（頸髄）での運動ニューロン数および大きさを免疫染色した脊髓組織切片を用いて計測した。運動ニューロンとしてコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）抗体陽性の錐体細胞数を計測したところ、AR2マウス群（非投与群）および溶媒投与群に比べて、脊髓前角あたりの運動ニューロン数は、アプタマー投与群いずれにおいても有意に増加した（図4）。さらに、脊髓前角運動ニューロン中のTDP-43の局在をTDP-43抗体による免疫染色組織切片にて観察したところ、AR2マウス（非投与群）および溶媒投与群に比べ、アプタマー投与群では、TDP-43の核内局在細胞数が増加した。野生型のような完全なる核のみの局在にまでは至らなかったが、核および細胞質内に局在する細胞数は増加した。

孤発性ALSモデルマウス（AR2マウス）を用いて、RNAアプタマーによるALSの治療効果への可能性を評価した。運動機能評価では、投与2～3週間後からRNAアプタマー投与群のローターロッドの歩行時間が上昇し、3か月後には運動機能低下は有意に改善された。また組織学的観察においても脊髓運動ニューロン数の増加、核内TDP-43局在を含む細胞数が増加しTDP-43病理の改善傾向が観られた。さらに、AMPA受容体拮抗薬使用時に多くみられる副作用としての鎮静作用も低く、治療薬として十分可能性が期待できるものと考えられた。

今後の課題として、RNAアプタマー投与を中止した後もその効果を保つことが可能か、またさらに低用量での改善が可能かなどの検討を考えている。また、本検討ではRNAアプタマーを直接脳室内に投与したが、さらに有効で簡便な投与経路を開発する必要があると思われる。具体的には、点鼻による投与方法や、ナノパーティクル等へRNAアプタマーを導入して静脈経由の投与を行うなど、投与形態や経路についてさらに追及したいと考えている。さらに、正常なAMPA受容体の機能を保持しつつ、異常なカルシウム透過性をもつAMPA受容体の未編集型サブユニット特異的に拮抗作用を持つRNAアプタマーを探索し、さらに選択性と拮抗効果が高くそしてより安全性の高いALS治療薬の可能性を探りたいと考えている。本研究の成果は、Life Science Alliance誌オンライン版12, January, 2022, <http://doi.org/10.26508/lsa.202101193>に掲載された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akamatsu Megumi, Yamashita Takenari, Teramoto Sayaka, Huang Zhen, Lynch Janet, Toda Tatsushi, Niu Li, Kwak Shin	4. 巻 5
2. 論文標題 Testing of the therapeutic efficacy and safety of AMPA receptor RNA aptamers in an ALS mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamashita T., Akamatsu M., Kwak S.	4. 巻 8(2)
2. 論文標題 Altered intracellular milieu of ADAR2-deficient motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes 8020060.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita T., Aizawa H., Teramoto S., Akamatsu M., Kwak S.	4. 巻 7:39994
2. 論文標題 Calpain-dependent disruption of nucleo-cytoplasmic transport in ALS motor neurons.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep39994.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 赤松 恵、山下 雄也、郭 伸	4. 巻 34-2
2. 論文標題 孤発性ALSの病態と治療－AMPA受容体阻害薬による筋萎縮性側索硬化症治療の可能性	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 86-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Megumi Akamatsu, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Zhen Huang, Tatsushi Toda, Li Niu, Shin Kwak
2. 発表標題 An AMPA receptor subunit-specific RNA aptamer rescued ALS phenotype in AR2 mice
3. 学会等名 The 42th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Megumi Akamatsu, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Zhen Huang, Li Niu, Shin Kwak
2. 発表標題 RNA aptamer as a potential drug candidate for ALS - rescue of clinicopathologic ALS phenotype in model mice
3. 学会等名 5th RNA Metabolism in Neurological Disease Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Akamatsu, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Zhen Huang, Li Niu, Shin Kwak
2. 発表標題 Target therapy for ALS with RNA aptamers - rescue of ALS phenotype resulting from loss of motor neurons with TDP-43 pathology in ALS model mice
3. 学会等名 Society for Neuroscience, Neuroscience 2018, annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Akamatsu, Takenari Yamashita, Sayaka Teramoto, Zhen Huang, Li Niu, Shin Kwak
2. 発表標題 AMPA receptor-specific RNA aptamers rescued ALS phenotype in conditional ADAR2 knockout mice
3. 学会等名 29th International Symposium on ALS/MND (国際学会)
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ニューヨーク州立大学オールバ ニ 校		