

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09773

研究課題名(和文) 生体内分化誘導によるALS神経再生戦略の開発

研究課題名(英文) In vivo differentiation control of endogenous neural cells in ALS

研究代表者

割田 仁 (Warita, Hitoshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：30400245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：筋萎縮性側索硬化症(ALS)は代表的な成人発症の運動ニューロン疾患で、脊髄および脳・脳幹の運動ニューロン変性により発症から数年で全身の筋萎縮・筋力低下が進行し、呼吸筋麻痺をきたす致死性の神経変性疾患である。本研究では成体脊髄におけるアストロサイト分化・増殖・新生を促進する分泌性糖蛋白、骨形成蛋白質(BMP)4が治療標的となり得ることを明らかにした。活性化アストロサイトで進行性に発現亢進するBMP-4に拮抗することで、神経炎症全体を抑制し、運動機能低下を抑え、生存期間延長をもたらすことをALSモデル動物で示した。活性化アストロサイトを標的とした新規治療戦略を開発すべく、応用研究を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、成人発症の難治性・進行性疾患の代表である筋萎縮性側索硬化症(ALS)において骨形成蛋白質(BMP)とその下流シグナルが新たな進行抑制治療の標的となり得ることを初めて明らかにしたものである。ALS同様に神経炎症を伴う他の神経変性疾患への応用も期待され、人口の高齢化とともに増加しつつある神経変性疾患の新しい進行抑制療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset, devastating neurodegenerative syndrome characterized by systemic loss of motor neurons with prominent gliogenesis in the central nervous system. We focused on bone morphogenetic proteins (BMP) as a major soluble protein that promotes astrocytogenesis and its activation in the adult spinal cord. In a transgenic rat model with ALS-linked mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene, BMP-4 was progressively up-regulated in spinal ventral horn reactive astrocytes, whereas noggin, a BMP-antagonist, was decreased. Continuous intrathecal infusion of either noggin or Bmp4-targeted antisense oligonucleotides after disease onset significantly ameliorated motor dysfunction and neurogenic muscle atrophy, and also extended survival of ALS model rats, by reducing astrocytogenesis, astrocytic activation, and neuroinflammation. The BMP-4 and its downstream signaling may be a novel therapeutic target for disease-modifying therapies in ALS.

研究分野：神経内科学

キーワード：神経再生 運動ニューロン アストロサイト 神経炎症

## 1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) は成人発症の神経変性疾患で、大脳皮質および脳幹・脊髄の運動ニューロンが系統的に変性脱落することが本態である。全身の骨格筋萎縮と筋力低下が進行し平均 3~5 年で呼吸筋麻痺に至る致死的疾患でありながら、いまだ症状改善をもたらす治療法が確立されていない。

さらに診断バイオマーカーも未確立のため早期診断が難しく、診断時点で相当数の運動ニューロンが変性脱落におちいつている。この不可逆的な神経変性が ALS 患者の運動機能障害に直結し、日常生活動作に重大な支障をもたらしている。もし神経変性を抑止する治療法が今後開発されたとしてもなお、いったん失われた運動ニューロンを中心とした「神経回路の再生」戦略が必須である。

発達期を過ぎた成体 (adult) においても哺乳類の脳から脊髄の広い中枢神経領域にわたって脳室 - 中枢神経軸に沿って神経幹細胞が存在している (内在性神経幹/前駆細胞)。本来、これらの細胞は自己複製能に加え多分化能をもち、ニューロン、アストロサイト、およびオリゴデンドロサイトに分化できる。ところが、生理的に可塑性が乏しくニューロン新生が生じていない部位で神経変性や損傷をもたらすものはグリア系細胞 (ミクログリアやアストロサイト) の増殖・活性化が主体で、ニューロン新生は検出できないが、あるいは変性脱落を補うには不十分と報告されている (Guan ら, 2007)。

この活発に増殖するグリア系細胞は慢性のグリア炎症 (Yamanaka ら, 2011) をきたし、結果的にニューロン傷害性物質や炎症性サイトカインを放出して ALS 病態悪化につながることで動物モデルや剖検ヒト脊髄で複数報告されており、ALS における内在性の神経再生はそのままでは機能回復には決定的に不十分と考えられる。したがって神経再生の観点からは、ALS 病態下の内在性神経幹/前駆細胞は増殖能が不足していることと、分化の方向性が誤っていることが想定される。しかしながら、神経幹/前駆細胞に対する増殖因子 (線維芽細胞増殖因子や上皮増殖因子) を ALS モデル動物に投与した既存研究では、内在性神経幹/前駆細胞やグリア前駆細胞の増加が報告されているものの、ニューロン新生は確認されておらず、ALS 進行抑制効果も得られていない。

以上より、ALS 治療法開発に必須な真の神経再生を実現するためには、再生のソースとなる細胞補充、再生しやすい微小環境の形成のみならず、生体内で効果的な分化誘導を行う必要があると考えられる。

## 2. 研究の目的

上記のような背景のもと本研究では、早期診断が難しく症状改善が実現できていない ALS における神経再生をめざし、体内で神経変性ととも活発に新生・増殖するグリア細胞、とくにアストロサイトを標的として、分化誘導因子の投与によるアストロサイト新生・活性化制御を試み、モデル動物における ALS 様病態進行への効果を検証した。

## 3. 研究の方法

自施設で確立した ALS における選択的運動ニューロン変性を再現する代表的モデル、ALS 関連ヒト His46Arg 変異 *SOD1* 遺伝子導入ラット (以下 ALS ラット) を対象とした (Nagai ら, 2001)。アストロサイト増生と新生を促進する主要な細胞外分泌性蛋白として骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein, BMP) ファミリーに着目し、脊髄および脳脊髄液における発現変動を解析した。その結果をふまえ、BMP-4 に標的を絞ってこれを阻害する 2 つの介入実験をおこなった。新生細胞はチミジンアナログ 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) の皮下持続投与により標識した。常法に則りリアルタイム定量的 PCR、免疫プロットティング、ELISA、多重蛍光免疫組織化学、また握力測定・着陸開脚試験を実施し運動機能を評価した。各実験に用いる動物数は必要最小限とし、保温や鎮痛作用をもつ麻酔薬を用いるなど、動物愛護に十分配慮した (所属施設の実験計画書承認番号: 2016 医組換-030, 2016 医動-106)。

## 4. 研究成果

発症後の ALS ラット脊髄前角では BMP ファミリーの中でも BMP4 のみの発現が活性化アストロサイトそのもので進行性に増加する一方、その内在性拮抗因子である noggin の発現は運動ニューロンの変性脱落と平行して減少していた。BMP ファミリーのうち BMP-2 および BMP-4 は神経幹細胞からのアストロサイト分化を促進する一方、ニューロンおよびオリゴデンドロサイト分化を抑制することが知られている。この BMP シグナリングを発症後から抑制し、運動ニューロン変性に伴う成体脊髄アストロサイトの分化増殖に介入する実験を計画した。

内在性 BMP-4 に拮抗する可溶性蛋白 noggin、あるいはラット BMP-4 発現を選択的にノック

ダウンできるアンチセンスオリゴヌクレオチドを脊髄腔内に持続投与した。発症後の介入であっても、ALS ラット脊髄で BMP シグナリングを抑制することで、新生アストロサイトの増加、活性化アストロサイトの増生、ミクログリア活性化といった神経炎症全体を抑制できた。その結果、運動機能低下を抑制し、生存期間の延長を有意にもたらすことができた。すなわち、ALS モデルラット成体脊髄アストロサイトの分化増殖促進因子が神経炎症をコントロールする上での治療標的となり得ることを明らかにできた。

本研究成果をふまえ、今後はその分子メカニズムの詳細を解明し、成体脊髄内における分化誘導をより効果的におこなうための基盤研究を推進する。さらに、新たな標的分子を探索する網羅的研究へと応用する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Mitsuzawa S, Akiyama T, Ono H, Nishiyama A, Izumi R, Kitajima Y, Aoki M	4. 巻 307
2. 論文標題 Antagonizing bone morphogenetic protein 4 attenuates disease progression in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Neurol	6. 最初と最後の頁 164-179
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2018.06.009	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12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 割田 仁
2. 発表標題 hnRNPA1変異によるMSP3型の病態解明研究
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 秋山徹也, 光澤志緒, 中村尚子, 小野洋也, 西山亜由美, 鈴木直輝, 青木正志
2. 発表標題 Microvasculature as a pro-inflammatory component in a rat model of ALS.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 四條友望, 割田 仁, 鈴木直輝, 池田謙輔, 光澤志緒, 秋山徹也, 小野洋也, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 青木正志
2. 発表標題 BMP4, a bone morphogenetic protein, accelerates disease progression of amyotrophic lateral sclerosis.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山徹也, 鈴木直輝, 石川 充, 川田治良, 藤井輝夫, 藤島史喜, 舟山 亮, 中山啓子, 三橋弘明, 割田 仁, 岡野栄之, 青木正志
2. 発表標題 Elucidating axonal pathophysiology under fused in sarcoma (FUS)-mutant ALS motor neurons.
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 割田 仁, 四條友望, 池田謙輔, 秋山徹也, 小野洋也, 光澤志緒, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 鈴木直輝, 青木正志
2. 発表標題 Cytoplasmic aggregation involving RNA-binding proteins in spinal cord of ALS model rats
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 割田 仁
2. 発表標題 神経疾患の新薬開発・医師主導治験の最前線：ALSに対する肝細胞増殖因子（HGF）
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山亜由美, 鈴木直輝, 割田 仁, 井泉瑠美子, 島倉奈緒子, 秋山徹也, 長名シオン, 加藤 昌昭, 新堀哲也, 青木洋子, 青木正志
2. 発表標題 Genotype-phenotype analysis of Japanese familial ALS pedigrees with SOD1 mutations
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺靖章, 中川 直, 鈴木直輝, 割田 仁, 中山啓子, 青木正志
2. 発表標題 ALS-associated C21ORF2 mutation enhances the autoregulation mechanism of NEK1
3. 学会等名 第59回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四條 友望, 割田 仁, 鈴木直輝, 池田謙輔, 小野洋也, 秋山徹也, 光澤志緒, 西山亜由美, 井泉瑠美子, 青木正志
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症モデル脊髄のアストロサイトにおける骨形成蛋白質の過剰発現
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shijo T, Warita H, Suzuki N, Ikeda K, Akiyama T, Ono H, Mitsuzawa S, Nishiyama A, Izumi R, Aoki M
2. 発表標題 Bone morphogenetic protein 4 is up-regulated in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan (INTERNATIONAL CONFERENCE CENTER KYOTO) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nishiyama A, Niihori T, Warita H, Izumi R, Akiyama T, Kato M, Suzuki N, Aoki Y, Aoki M
2. 発表標題 Targeted next-generation sequencing in Japanese familial amyotrophic lateral sclerosis reveals differences in the genetic variations across populations
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology, Kyoto, Japan (INTERNATIONAL CONFERENCE CENTER KYOTO) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ono H, Suzuki N, Kanno S, Izumi R, Takahashi T, Kitajima Y, Osana S, Akiyama T, Ikeda K, Shijo T, Mitsuzawa S, Warita H, Nagatomi R, Araki N, Yasui A Miyake K, Aoki M
2. 発表標題 Novel binding partner of dysferlin is required for plasma-membrane repair
3. 学会等名 22th International Annual Congress of the World Muscle Society, Saint Malo, France (Palais du Grand Large) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東北大学医学部神経内科  <a href="http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html</a>  東北大学研究者紹介  <a href="http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/37acc23a2ceeffbecab9d8569a61a9f2.html">http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/37acc23a2ceeffbecab9d8569a61a9f2.html</a>  Researchmap  <a href="https://researchmap.jp/warita_2012/">https://researchmap.jp/warita_2012/</a>  ResearchGate  <a href="https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi_Warita">https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi_Warita</a>  東北大学医学部神経内科  <a href="http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html">http://www.neurol.med.tohoku.ac.jp/index.html</a>  東北大学研究者紹介  <a href="http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/37acc23a2ceeffbecab9d8569a61a9f2.html">http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/37acc23a2ceeffbecab9d8569a61a9f2.html</a>  Researchmap  <a href="https://researchmap.jp/warita_2012/">https://researchmap.jp/warita_2012/</a>  ResearchGate  <a href="https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi_Warita">https://www.researchgate.net/profile/Hitoshi_Warita</a></p>
---

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
研究協力者	四條 友望  (Shijo Tomomi)		
研究協力者	鈴木 直輝  (Suzuki Naoki)		
研究協力者	青木 正志  (Aoki Masashi)		