

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07398

研究課題名（和文）酸化ストレス性細胞死抑制因子を指標とした神経変性疾患のバイオマーカーの同定

研究課題名（英文）Identification of biomarkers of neurodegenerative diseases using oxidative stress-induced cell death inhibitory factor as an indicator.

研究代表者

狩野 修（Kano, Osamu）

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：20459762

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：酸化ストレスに起因する細胞死を選択的に抑制する末梢血中neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) に着目し、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の診断や進行及び治療薬効果の分子指標となるバイオマーカーになりうる可能性があることを示してきた。次のステップとして、神経変性疾患（ALS、パーキンソン病、アルツハイマー型認知症）患者ならびに健常者を対象に、末梢血中NAIPをタンパク質解析し、さらにNAIP-RNAの定量を行い、より簡便な方法を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAIPがALSをはじめとした神経変性疾患の診断のバイオマーカーとして確立されれば、早期診断、早期治療介入が可能になり、患者の生命予後延長のみならず、介護者を含めたQOLの向上に繋がると推測される。将来的には治療ターゲットとしてNAIPの産生を誘導する化合物が重要になり、創薬分野への新たな方向性を示すことが可能になる。

研究成果の概要（英文）：We have focused on neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) in peripheral blood, which selectively inhibits oxidative stress-induced cell death and may be a potential biomarker for diagnosis and progression of amyotrophic lateral sclerosis (ALS), as well as a molecular indicator of therapeutic drug efficacy. We have shown that NAIP is a potential biomarker for the diagnosis and progression of ALS and for the efficacy of therapeutic drugs. As a next step, we have demonstrated a more convenient method for protein analysis of NAIP in peripheral blood and quantification of NAIP-RNA in patients with neurodegenerative diseases (ALS, Parkinson's disease, and Alzheimer's disease) and healthy subjects.

研究分野：脳神経内科

キーワード：筋萎縮性側索硬化症 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

活性酸素種等による持続的な酸化ストレスは、筋萎縮性側索硬化症 (Amyotrophic lateral sclerosis: ALS) をはじめパーキンソン病 (Parkinson's disease: PD)、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer's disease: AD) などの代表的な神経変性疾患の発症・進行の分子学的背景として重要視されている。我々はこれまでの一連の ALS 分子病態研究において、酸化ストレスによって誘導される内在性因子 NAIP (IAP family proteins の founding protein) が、運動ニューロンの変性抑制と保護に重要な役割を演じていることを報告してきた。NAIP の産生を誘導する複数の低分子化合物 (新規化合物、既存 PD 治療薬プロモクリプチン等) が ALS モデルマウス薬効試験で顕著な薬効を示すことを明らかにし [Tanaka K et al. PLoS One, 2014]、さらに ALS 患者を対象にした医師主導臨床試験 (Phase 2) では、プロモクリプチンの有意な進行抑制効果を報告した [Nagata et al. PLoS One, 2016]。ALS における運動ニューロンの変性は酸化ストレスに起因し、さらに慢性炎症の蓄積であるという結果を ALS モデルマウス (mSOD1Tg マウス) で報告した [Kano O (申請者) et al. Neurology, 2012]。また池田氏 (連携研究者) との共同研究により、末梢血での NAIP 発現は単核球に限られていること、発症初期 (確定診断時) ALS 患者群の末梢血単核球の NAIP 量は健常者群のその約 50%であったこと、12 ヶ月間に渡る経時的解析から、運動機能 (ALSFRS-R) の変化率と NAIP 量に有意な負の相関関係 (NAIP の発現量が低いほど、ALS の運動機能悪化する) が認められることが明らかになった [Kano O (申請者) et al. Sci Reports, 2018]。これらの結果から、NAIP が ALS をはじめとした神経変性疾患の診断や治療効果判定のバイオマーカーになりうる可能性があるとの発想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、調製保存した RNA 及び単核球を用い、それぞれ定量 NAIP-RT-PCR (NAIP-qPCR) と NAIP-イムノドットプロット法の両方を行い、NAIP 量を測定する。NAIP のタンパク質と、NAIP の RNA レベルの相関関係を示し、より簡便な NAIP 遺伝子レベルの検出系を確立する。

3. 研究の方法

患者ならびに健常者より採取した血液は同日中に RNA 用と血球分離用に分け処理 (単核球分離用採血管を用いて単核球を分離) し、-80 で保存する。そして NAIP-RNA と NAIP タンパク質量との相関関係を明らかにする。

<被験者選択基準>

すべての対象被験者は 20 歳以上 80 歳未満とし、同意取得後、採血 15ml を行う。

<末梢血 NAIP タンパク質量及び NAIP-RNA の定量>

NAIP タンパク質量の定量：単核球分離用採血管を用いて単核球を分離する。全細胞抽出試薬を用いてタンパク質を抽出し、一定タンパク質濃度に調製したサンプルを PVDF 膜にプロットし、抗 NAIP 抗血清によるドットプロット・蛍光強度測定法で NAIP タンパク質量を定量する (NAIP リコンビナントタンパク質を標準品とする)。

NAIP-RNA の定量：全血から RNA 精製キット (NucleoSpin® RNA blood) を用い RNA を抽出する。RNA 画分中の NAIP-RNA をインターカレーター法 (SYBR Green 検出) - ワンステップ qPCR で定量する。

4. 研究成果

<NAIP タンパク質量>

抗 NAIP 抗血清を用いたドットプロット法の結果を図 1 に示す。

<RNA 抽出の検討>

RNA 抽出キットを用いて凍結ヒト血液試料から RNA 抽出を行い、RNA の品質チェックを Agilent 4200 Tape Station (アジレント・テクノロジー株式会社) で確認した。

RNA 抽出試薬添加後凍結保存されていた全血 (C1 ~ C11)、検討及び検量線作成用に採取した健常人全血 (凍結品 Blood#3 及び RNA 抽出試薬添加後凍結品 Blood#5DL) 約 0.4 mL から 1.91 ~ 4.79 µg の total RNA が抽出できた (製品情報による収量: 1.2 ~ 8 µg)。また、RNA の品質の指標である RIN® 値が C-1 で 4.4 と低値であったが、それ以外では 6.7 ~ 8.5 と高い値を示し RNA 分解の影響を受けておらず、qPCR の実施に影響ないと判断した。

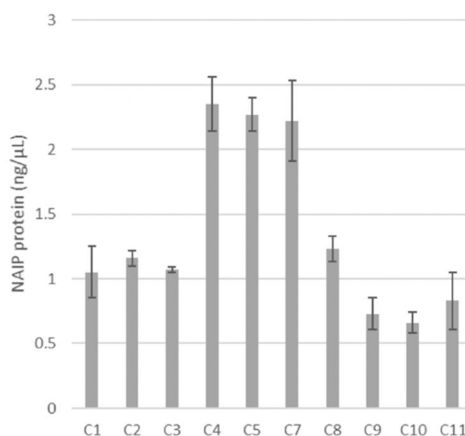


図 1 NAIP タンパク質量

<NAIP プライマーの特異性の検討>

NAIP 遺伝子の情報を基に、NAIP1 プライマー (NAIP-EX4F_TM/NAIP-EX5R_TM、増幅サイズ:85 bp)、NAIP2 プライマー (NAIP-EX5F_ncbi/NAIP-EX7_8R_ncbi、増幅サイズ:191 bp)、NAIP3 プライマー (NAIP-EX16F_SR/NAIP-EX17R_SR、増幅サイズ:300 bp)、NAIP4 プライマー (NAIP-EX16F_ncbi/NAIP-EX17R_ncbi、増幅サイズ:138 bp) の4種類を作成した。

標準物質 NAIP plasmid を鋳型とし、KAPA SYBR Fast Universal を用いた 2-step qPCR を実施し、NAIP プライマーの特異性を検討した。その結果、NAIP plasmid に対して NAIP1~NAIP4 プライマーはすべて増幅し、直線性が確認できた。また、プライマーダイマーの増幅は認められなかった。先に実施した予備検討のヒト全血由来 total RNA を鋳型とした 1-step qPCR において、NAIP2 及び NAIP3 プライマーの増幅効率が低かったことから、血液から得られた RNA を鋳型として実施する qPCR には最適ではないと判断し、以降の試験には NAIP1 及び NAIP4 プライマーを使用することとした。なお、NAIP1 プライマーは exon 4 から exon 5、NAIP4 プライマーは exon 16 から exon 17 の位置にプライマーを設定していることから、NAIP1 プライマーにより NAIP 遺伝子の前半部分 (N 末端領域)、NAIP4 プライマーにより NAIP 遺伝子の後半部分 (C 末端領域) を検出することができる。2つの NAIP プライマーセットで qPCR を実施することで、分解を受けていない完全長の NAIP 遺伝子の発現解析が可能となり、データの採用の際に RNA 分解による影響を排除できることが期待された。

<Reference 遺伝子プライマーの特異性の検討>

論文検索により、ヒト血液で最適な reference 遺伝子を検索し、hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) の3種類の遺伝子についてプライマーを作成した。

ヒト全血由来 total RNA を鋳型とし 1-step qPCR を実施し、reference 遺伝子プライマーの特異性を検討した。その結果、ヒト全血由来 total RNA に対して HPRT1、GAPDH、PGK1 プライマーはすべて増幅し、直線性が確認できた。また、プライマーダイマーの増幅は認められなかった。検討したすべての reference 遺伝子プライマーは効率よく増幅することが確認されたことから、ヒトの血液で効率よく増幅できるとの報告のある PGK1 を reference 遺伝子プライマーに採用した。

<total RNA の最適な鋳型量の検討>

先に実施した予備検討において、ヒト全血由来 total RNA を 20 µL 反応系あたり 0.08~80 ng の (0.08~80 ng/reaction、以下 ng/rxn と略す) のレンジの鋳型量で NAIP1 及び NAIP4 プライマーを用いて 1-step qPCR を実施した結果、最高用量の 80 ng/rxn において増幅阻害が認められた。血液中には PCR の増幅を阻害する物質が数多く含まれていることが報告されていることから、最適な鋳型量の検討が必要であると判断した。

ヒト全血由来 total RNA を 10~1.25 ng/µL まで公比 2 で希釈した鋳型を用いて 1-step qPCR を実施し、NAIP1、NAIP4 及び PGK1 プライマーの増幅効率を検討した。その結果、2.5~20 ng/rxn の範囲の鋳型量であれば阻害の影響は受けず、効率よく増幅することが確認できた。

<NAIP-qPCR>

本試験として、予備試験で設定した以下の条件で 1-step qPCR を実施し、解析した。

- 健常者全血由来 total RNA (10 ng/rxn) を鋳型
- NAIP1 及び NAIP4 プライマー
- Reference 遺伝子として、PGK1 プライマー
- 各サンプルは 3 重測定
- 健常者全血由来 total RNA (Blood#3) を鋳型として検量線を作成、Quantity を算出、PGK1 で補正後、検体 C-3 の値を 1 とし NAIP 発現量を比較
- Ct 法により NAIP 発現量を比較 (検体 C-3 の発現量を 1 とした場合)

本試験の結果を表 1 に示す。qPCR のデータを検量線法及び Ct 法で解析したところ、ほぼ同様の結果が得られた。また、NAIP1 プライマーで得られた NAIP 発現量の値をそれぞれ 1 とした場合の NAIP4 プライマーで得られた NAIP 発現量を解析した結果、Ct 法で評価した方が、検量線法に比べ NAIP1 (N 末端領域) 及び NAIP4 (C 末端領域) プライマーの検出感度が 1:1 であることが確認された。

本試験で検討した健常者の単核球中の NAIP タンパク質量はドットプロット法によりすでに定量されていることから、NAIP の発現量についてタンパク質と遺伝子レベルで比較可能である。本試験の結果から、NAIP の発現量はタンパク質と遺伝子レベルで一部相関性が認められる挙動を示した。

Sample Name	NAIP protein (ng/ug)	検量線法(C3 =1)		ΔCt法(C3 =1)	
		NAIP1 (PGK1で補正)	NAIP4 (PGK1で補正)	相対比 NAIP1の発現比較 (PGK1で補正)	相対比 NAIP4の発現比較 (PGK1で補正)
C-1	1.05	1.06	1.29	1.08	0.99
C-2	1.16	1.02	1.24	1.02	0.99
C-3	1.07	1.00	1.22	1.00	1.00
C-4	2.35	1.60	1.95	1.72	1.80
C-5	2.27	1.35	1.65	1.40	1.60
C-7	2.22	1.82	2.22	1.98	1.83
C-8	1.23	1.04	1.27	1.04	0.98
C-9	0.73	1.01	1.24	1.02	1.05
C-10	0.66	1.88	2.29	2.04	2.03
C-11	0.83	1.99	2.43	2.18	1.74

表 1 NAIP タンパク質量ならびに NAIP-RNA 量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morioka Harumi, Murata Kiyoko, Sugisawa Tatsuki, Shibukawa Mari, Ebina Junya, Sawada Masahiro, Hanashiro Sayori, Nagasawa Junpei, Yanagihashi Masaru, Hirayama Takehisa, Uchi Masayuki, Kawabe Kiyokazu, Ebihara Satoru, Murakami Yoshitaka, Nakajima Takashi, Kano Osamu	4. 巻 61
2. 論文標題 Effects of Long-term Hybrid Assistive Limb Use on Gait in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1479 ~ 1484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.8030-21	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 Morioka Harumi, Hirayama Takehisa, Sugisawa Tatsuki, Murata Kiyoko, Shibukawa Mari, Ebina Junya, Sawada Masahiro, Hanashiro Sayori, Nagasawa Junpei, Yanagihashi Masaru, Uchi Masayuki, Kawabe Kiyokazu, Washizawa Naohiro, Ebihara Satoru, Nakajima Takashi, Kano Osamu	4. 巻 99
2. 論文標題 Robot-assisted training using hybrid assistive limb ameliorates gait ability in patients with amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 158 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2022.02.032	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 Hirayama Takehisa, Izumi Yuishin, Nakayama Yuki, Shibukawa Mari, Ebihara Satoru, Kano Osamu	4. 巻 122
2. 論文標題 Communicating the diagnosis: a survey of patients with amyotrophic lateral sclerosis and their families in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neurologica Belgica	6. 最初と最後の頁 471 ~ 478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13760-021-01801-3	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 -

1. 著者名 Yanagihashi Masaru, Sugisawa Tatsuki, Fuchimoto Masaaki, Saotome Yuuichi, Onozawa Keiko, Matsumoto Yukinori, Bokuda Kota, Ebina Junya, Shibukawa Mari, Hirayama Takehisa, Murakami Yoshitaka, Washizawa Naohiro, Ebihara Satoru, Kano Osamu	4. 巻 60
2. 論文標題 Contradictory Responses to the COVID-19 Pandemic in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients and Their Families and Caregivers in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 1519 ~ 1524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6810-20	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 狩野 修、平山 剛久、柳橋 優、海老原 覚	4. 巻 38
2. 論文標題 One teamで行う半日コースのALSクリニック	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 神経治療学	6. 最初と最後の頁 464 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15082/jsnt.38.4_464	査読の有無 無
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 平山 剛久、狩野 修	4. 巻 27
2. 論文標題 ALS患者さんと共に歩む意思決定へのプロセス	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 難病と在宅ケア	6. 最初と最後の頁 48〜50
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 無
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 -

1. 著者名 渋川茉莉、森岡治美、花城里依、長澤潤平、狩野 修	4. 巻 39
2. 論文標題 筋萎縮性側索硬化症のバイオマーカー研究の最前線	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharma Medica	6. 最初と最後の頁 75 ~ 78
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14件(うち招待講演 8件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 狩野 修、平山 剛久、柳橋 優、海老原 覚
2. 発表標題 One teamで行う半日コースのALSクリニック
3. 学会等名 第38回日本神経治療学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野 修、平山 剛久、渋川 茉莉、柳橋 優
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症のDisease-modifying Therapy にむけた新たなパイプライン
3. 学会等名 第42回日本臨床薬理学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平山 剛久、狩野 修、和泉唯信
2. 発表標題 ALS 患者、家族への病状説明に関する調査結果
3. 学会等名 令和3年度神経変性班班会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野修、渋川茉莉、柳橋優、平山剛久、森岡治美
2. 発表標題 運動ニューロン疾患における自律神経障害と機能回復
3. 学会等名 第74回日本自律神経学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野 修、寺田一志
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症の早期診断、QOL向上、生存期間延長に向けた挑戦
3. 学会等名 第57回日本医学放射線学会秋季臨床大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野 修
2. 発表標題 酸化ストレス性細胞死抑制因子を指標とした筋萎縮性側索硬化症バイオマーカーの同定
3. 学会等名 第 158 回東邦医学会例会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野 修、森岡治美、平山剛久、海老原覚
2. 発表標題 ALS治療とリハビリテーション医療の接点
3. 学会等名 第58回日本リハビリテーション医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirayama T、Sugisawa T、Yanagihashi M、Morioka H、Shibukawa M、Hanashiro S、Nagasawa J、Ebina J、Okamoto R、Yamada T、Zama J、Onozawa K、Fuchimoto M、Saotome Y、Washizawa N、Ebihara S、Kano O
2. 発表標題 Multidisciplinary clinic might avoid emergency hospitalization of ALS patients
3. 学会等名 PACTALS2021NAGOYA（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kano O
2. 発表標題 Developing multidisciplinary clinic and educational webinar inJapan
3. 学会等名 PACTALS2021NAGOYA（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Kawabe K、Kano O
2 . 発表標題 A clinical simulation laboratory is useful for ALS patients' families
3 . 学会等名 PACTALS2021NAGOYA (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Morioka H、Murata K、Sugisawa T、Shibukawa M、Ebina J、Sawada M、Hanashiro S、Nagasawa J、Yanagihashi M、Hirayama T、Kawabe K、Uchi M、Ebihara S、Murakami Y、Nakajima T、Kano O
2 . 発表標題 The long-term effects of cyborg-assisted training using Hybrid Assistive Limb in ALS patients
3 . 学会等名 PACTALS2021NAGOYA (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Morioka H、Murata K、Sugisawa T、Shibukawa M、Ebina J、Sawada M、Hanashiro S、Nagasawa J、Yanagihashi M、Hirayama T、Kawabe K、Uchi M、Ebihara S、Murakami Y、Nakajima T、Kano O
2 . 発表標題 The effects of one course of Hybrid Assistive Limb treatment on gait ability in ALS patients
3 . 学会等名 PACTALS2021NAGOYA (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 Shibukawa M、Hirayama T、Yanagihashi M、Morioka H、Nagasawa J、Ebina J、Okamoto R、Kawabe K、Iguchi H、Kawase Y、Nakayama Y、Izumi Y、Kano O
2 . 発表標題 How to break the bad news: a survey of patients with ALS and their families
3 . 学会等名 PACTALS2021NAGOYA (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名 狩野 修
2. 発表標題 One teamで行う半日コースのALSクリニック
3. 学会等名 第38回日本神経治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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	星 秀夫 (Hoshi Hideo) (30568382)	東邦大学・医学部・講師 (32661)	

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
---------	---------