

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15361

研究課題名(和文) 運動ニューロン疾患における神経回路障害の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of neurocircuit in motor neuron diseases

研究代表者

飯田 円 (Iida, Madoka)

名古屋大学・医学系研究科・学振特別研究員(RPD)

研究者番号：40815437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：球脊髄性筋萎縮症(SBMA)は緩徐進行性の神経筋疾患あり、根本的な治療法はない。我々はSBMAマウスモデルの脊髄と骨格筋を用いて網羅的シグナル解析を行い、発症前からSrcシグナルが活性化していることを見出した。本研究ではSBMA患者の脊髄と骨格筋においてもSrcシグナルが活性化していることを明らかにした。またSrc阻害薬がSBMAマウスモデルにおける病態の進行を抑制することを示し、Srcの下流分子であるp130Casが重要な役割を果たしていることを見出した。さらにSBMAにおいてSrcのリン酸化が上昇する機序として、アンドロゲン受容体とSrcの結合が重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Src阻害薬はSBMAの新規治療薬として有望であると考えられた。Srcは様々な癌で活性化し癌の進行や転移に関連することが知られており、Src阻害薬の中には癌の治療薬として臨床応用されている薬剤もしくは治験中の薬剤が複数存在する。本研究は神経筋疾患と癌の共通項を見出し、Src阻害薬が神経難病や癌の治療薬となりうる新たな可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) is an adult-onset, progressive neuromuscular disease caused by the expanded CAG repeats in the androgen receptor (AR) gene. We performed a comprehensive analysis of signaling pathways in a mouse model of SBMA (AR-97Q mice) and revealed that the level of phosphorylated Src (p-Src) was markedly increased in the spinal cords and skeletal muscles of AR-97Q mice prior to the onset. Src phosphorylation was also elevated in motor neurons and skeletal muscles of the patients with SBMA. We identified p130Cas as effector molecules of Src. We also revealed that the interaction between Src and AR plays an essential role in the activation of Src pathway in the pathogenesis of SBMA. Finally, the administration of compound X, a novel SKI, ameliorated the neurological phenotype of the mouse model of SBMA.

研究分野：運動ニューロン疾患

キーワード：球脊髄性筋萎縮症 Srcシグナル異常 Src阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動ニューロン疾患は進行性の筋力低下と筋萎縮をきたす難病であり、運動ニューロンの変性・脱落をみとめるが、分子病態は不明であり根本的治療法は見出されていない。代表的な疾患として筋萎縮性側索硬化症 (ALS) と球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) があり、呼吸不全などにより致命的な経過をたどる。SBMA は AR 遺伝子の CAG 繰り返し塩基配列 (CAG リピート) の異常伸長により遺伝子性の運動ニューロン変性や筋変性を呈する神経筋疾患である。核内に異常に蓄積したポリグルタミン蛋白は転写因子などの機能を阻害することで細胞の機能低下を引き起こすと考えられている。

我々は、病態の根幹に寄与する本質的分子メカニズムを明らかにし、より根源的な治療法を見出すことを目標とした。そのため幅広い分子シグナルを網羅的に探索する必要性を考え、さらに脊髄と骨格筋両方のシグナル変化を発症前から検討することで病態の根幹に関わる分子異常を解析した。まず、我々が作成したヒト変異 AR トランスジェニックマウス (AR-97Q) (Katsuno et al. Neuron. 2002) の3つの病期 (発症前、発症前期、発症後期) における脊髄と骨格筋を採集した。各サンプルからタンパクを抽出し、Bio-Plex マルチプレックスシステムを用いて、複数のシグナルにおける代表的な分子 (計 17 個) のリン酸化を同時に測定した。その結果 Src のリン酸化が、野生型マウスと比較して SBMA マウスモデルの脊髄において発症前から発症後期まで一貫して有意差をもち上昇しており、さらに SBMA マウスモデルの骨格筋においても発症前、発症前期で上昇していることが明らかになった。これらの結果をもとに SBMA 細胞モデルにおける変化を検証した。マウス神経幹細胞である NSC とマウスの筋芽細胞である C2C12 を用いて、コントロール細胞 (AR-24Q) と SBMA 細胞モデル (AR-97Q) の安定発現株を作成した。これらの細胞に Src 阻害薬である A419259 trihydrochloride を投与したところ、0.02 ~ 0.2 μ M の濃度で AR-97Q 細胞モデルにおける viability が改善した。一方各培養細胞に Src を一過性強制発現させると Src のリン酸化は上昇して viability は低下した。以上の結果より Src のリン酸化上昇が SBMA 細胞モデルの病態を増悪させ進行を加速する可能性が示唆された。そこで in vivo での効果を検証すべく、A419259 を SBMA マウスモデルに投与して病態に与える影響を解析した。溶解性や脳血液関門の通過性を評価し、0.5mg/kg/day の A419259 を3日に一回の頻度で腹腔内投与したところ、非投与群 (N=19) と比較して A419259 投与群 (N=21) において運動機能や生存率が改善した (図1)。

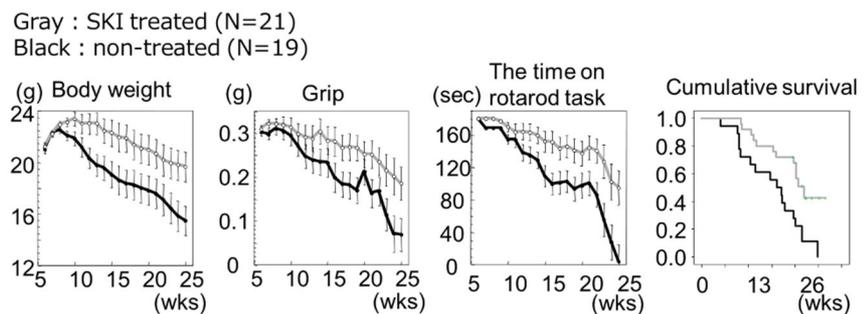


図1. SBMAマウスモデルにおけるA419259の効果

2. 研究の目的

A. SBMA モデルマウスにおける Saracatinib の効果

我々はこれまで SBMA において Src のリン酸化上昇が病態の悪化に寄与することを明らかにした。本研究では新規 Src 阻害剤 X に注目し SBMA モデルマウスにおける有効性を検討するとともに、Src 阻害薬の作用機序および作用点を Src のエフェクター分子を中心に検討し、SBMA の分子シグナル病態の解明を進める。

B. 運動ニューロン-後根神経節 (DRG) ネットワーク変性の解析

SBMA では感覚神経障害により DRG から運動ニューロンへのインプットが障害されていると考えられる。アンドロゲン受容体 (AR) -flox マウスを用いて運動ニューロンと DRG に共通する分子異常を見出し新たな治療標的分子を同定する。

3. 研究の方法

A. SBMA モデルマウスにおける Saracatinib の効果

SBMA マウスモデルにおける Saracatinib の有効性の解析

SBMA マウスモデルに saracatinib を投与して運動機能 (体重、握力、Rotarod テストによる歩行機能など) や生存期間を分析し有効性の評価を行うとともに、安全性を解析する。

Src 下流分子の overexpression/knock down による作用の解明

SBMA 細胞モデルにおける Src の下流分子の変化を解析する。Src のエフェクター分子は Akt、p38MAPK、p130Cas、Stat3 などが挙げられる。これらのリン酸化レベルについてウエスタンブロットを用いてコントロール細胞と比較する。また各細胞モデルに A419259 や saracatinib を投与し、下流分子の変化を解析する。変化をみとめた分子については、細胞に一過性強制発現もしくは siRNA による knock down を行った上で細胞の viability を測定し、病態への関与を検討する。

AR と Src の関連についての検討

SBMA において Src のリン酸化上昇が生じるメカニズムを検討する。SBMA では AR の異常活性化を来し、それが Src の活性化と関連している可能性があるため、野生型の細胞や野生型マウスもコントロールとして用い、リン酸化 Src の変化や AR と Src の interaction の推移を解析する。

SBMA 患者における Src シグナル変化の解析

SBMA 患者由来の iPS 細胞や筋生検組織を用いて、Src のリン酸化レベルを健常者と比較する。

B. 運動ニューロン-後根神経節 (DRG) ネットワーク変性の解析

AR-flox マウスの作成

CAG リピートが 97 個に延長したヒト AR を loxP 配列で挟む配列を有するマウスを作成する。

DRG 特異的変異 AR knock down の効果の解析

DRG と感覚神経特異的に Cre recombinase が発現している Advillin-Cre driver mouse を AR-flox マウスと交配させ、DRG や感覚神経において変異 AR が除かれたマウスを作成する。下位運動ニューロンへの異常なインプットが抑制されることで運動ニューロンや骨格筋の変性がどのように変化するかを、ウエスタンブロットや病理学的解析により解析する。また DRG 自体の分子シグナル病態についても、同様に解析する。

4. 研究成果

A. SBMA モデルマウスにおける Saracatinib の効果

まず SBMA マウスモデルに対して、Y 社のオープンイノベーションにより供与を受けた Src 阻害薬 X を投与して効果を解析した。Src 阻害薬 X を SBMA モデルマウスに腹腔内投与すると神経筋変性の抑制効果をもとめ (図 2)、Src 阻害薬は SBMA の新規治療薬として有望であると考えられた。

次に Src 阻害薬の作用機序を明らかにすべく、A419259 投与群と vehicle 投与群の SBMA 細胞モデル (神経細胞と筋芽細胞) とマウスモデル (脊髄と骨格筋) を用いて Src のエフェクター分子のリン酸化レベルを評価した。その結果、A419259 の投与により p130Cas のリン

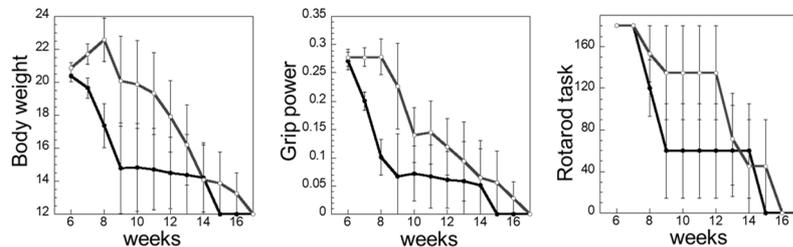


図 1. SBMA マウスモデルにおける Src 阻害薬 X の効果 ● Vehicle 投与群 (N=3) ○ Src 阻害薬 X 投与群 (N=4)

酸化が全てのモデルで有意に抑制されていることが明らかとなった。そこで SBMA 細胞モデルに p130Cas を一過性強制発現させると細胞の viability は低下し、siRNA を用いて p130Cas の発現を抑制すると細胞の viability が改善したため、p130Cas の活性化が SBMA の病態に重要であることが示された (図 2)。

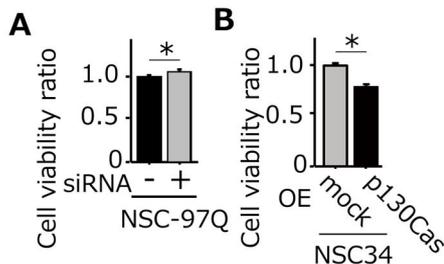


図 2. p130Cas の siRNA (A) と一過性強制発現 (B) の効果

さらに SBMA の病態において Src が活性化する機序を解明するために、野生型細胞株 (NSC34、C2C12) とコントロール細胞モデル (AR-24Q) における Src のリン酸化を比較した。その結果、AR-24Q 細胞において Src のリン酸化が上昇しており、Src の活性化に AR の本来の機能が関与していることが示唆された。また SBMA 細胞モデルを用いて AR と Src の結合を阻害して Src のリン酸化レベルを解析すると、AR と Src の結合を阻害した細胞モデルでは Src のリン酸化が低

下しており、Src の活性化には AR と Src の直接的な結合が重要であると考えられた。

SBMA 患者の筋生検組織や iPS 細胞を用いて Src のリン酸化を解析すると、SBMA 患者の筋生検組織ではコントロールと比較して Src のリン酸化が上昇しており、また SBMA 患者より樹立した iPS 細胞由来運動ニューロンにおいても Src のリン酸化が亢進していた。さらにヒト骨格筋細胞に AR を一過性強制発現させると Src のリン酸化が上昇し、これらの結果より SBMA 患者においても Src シグナルが活性化していることが明らかとなった。

B. 運動ニューロン-後根神経節 (DRG) ネットワーク変性の解析

Thermo Fisher Scientific 社にて GeneArt 遺伝子合成を依頼し、4 つの Fragment に分かれた人工遺伝子が納品された。これらの遺伝子断片を In-fusion cloning (Clontech) を用いて融合し、CAG リピートが 97 個に延長したヒト AR を loxP 配列で挟み、C 末端に NanoLuc ルシフェラーゼ配列をもつ全長約 4.5kbp の人工遺伝子を合成し、マウス受精卵へのインジェクションを行い AR-Flox マウスの作成を進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iida Madoka, Sahashi Kentaro, Kondo Naohide, Nakatsuji Hideaki, Tohnai Genki, Tsutsumi Yutaka, Noda Seiya, Murakami Ayuka, Onodera Kazunari, Okada Yohei, Nakatochi Masahiro, Tsukagoshi Okabe Yuka, Shimizu Shinobu, Mizuno Masaaki, Adachi Hiroaki, Okano Hideyuki, Sobue Gen, Katsuno Masahisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Src inhibition attenuates polyglutamine-mediated neuromuscular degeneration in spinal and bulbar muscular atrophy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12282-7	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 Kondo Naohide, Tohnai Genki, Sahashi Kentaro, Iida Madoka, Kataoka Mayumi, Nakatsuji Hideaki, Tsutsumi Yutaka, Hashizume Atsushi, Adachi Hiroaki, Koike Haruki, Shinjo Keiko, Kondo Yutaka, Sobue Gen, Katsuno Masahisa	4. 巻 11
2. 論文標題 DNA methylation inhibitor attenuates polyglutamine induced neurodegeneration by regulating Hes5	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 e8547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/emmm.201708547	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 Ito D, Hashizume A, Hijikata Y, Yamada S, Iguchi Y, Iida M, Kishimoto Y, Moriyoshi H, Hirakawa A, Katsuno M	4. 巻 266
2. 論文標題 Elevated serum creatine kinase in the early stage of sporadic amyotrophic lateral sclerosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurol.	6. 最初と最後の頁 2952-2961
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00415-019-09507-6	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Madoka Iida, Kentaro Sahashi, Naohide Kondo, Hideaki Nakatsuji, Genki Tohnai, Yutaka Tsutsumi, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Development of the therapeutics targeting the spatiotemporal dysregulation of signaling pathways in spinal and bulbar muscular atrophy
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 Madoka Iida, Kentaro Sahashi, Naohide Kondo, Hideaki Nakatsuji, Genki Tohnai, Yutaka Tsutsumi, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Development of the therapeutics targeting the spatiotemporal dysregulation of signaling pathways in spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Madoka Iida, Kentaro Sahashi, Naohide Kondo, Hideaki Nakatsuji, Genki Tohnai, Gen Sobue, Masahisa Katsuno
2. 発表標題 Src inhibition attenuates polyglutamine-mediated neuromuscular degeneration in spinal and bulbar muscular atrophy
3. 学会等名 AMED-MRCシンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----