

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390240
 研究課題名（和文）筋萎縮性側索硬化症モデルマウスの免疫療法とミクログリアの病態解析についての研究
 研究課題名（英文）Development of an immunotherapy against ALS model mice and analysis of the role of microglia in the pathogenesis of ALS
 研究代表者
 漆谷 真（URUSHITANI MAKOTO）
 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・准教授
 研究者番号：60332326

研究成果の概要（和文）：難治性神経変性疾患である ALS は原因不明で有効な治療法が存在しない。我々はスーパーオキシドジスムターゼ 1(SOD1)の突然変異を有する家族性 ALS のモデルマウスを用いてワクチン療法の改良と新規抗体療法の開発、ミクログリアが ALS 病態に及ぼす役割について検討した。その結果、野生型 SOD1 の金属非配位状態（アポ型）がワクチンとして有効であり、その投与によって脊髄病巣でインターロイキン 4(IL4)の発現が増加し、炎症促進サイトカインである tumor necrosis factor α (TNF)や interferon gamma (IFN γ)の発現が抑制されることを明らかにした。さらに変異 SOD1 を特異的に認識するモノクローナル抗体の開発に成功し、その ALS モデルマウスへの髄腔内投与方法の開発と進行抑制効果を確認した。また細胞外に分泌されたミクログリアが CD14 を介して活性化され神経毒性を有することを明らかにした。ワクチンと抗体療法は、抗原の特化や抗体の分子変換によって今後さらに発展が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal neurodegenerative disease with unknown etiology. The aim of this research project was to improve the vaccination and a passive immunization with a novel monoclonal antibody against mutant SOD1 using ALS model mice, and to clarify the roles of microglia in mutant SOD1-linked ALS. We found apo-form of WT SOD1 is an effective vaccine compared with mutant SOD1, which induces a protective immunity with the increase in interleukin-4 and the decrease in interferon-gamma and tumor necrosis alpha. The therapeutic effect of intrathecal infusion of one clone of the mutant SOD1-specific antibodies to slow the progression was confirmed. We also clarified the crucial role of CD14 of the microglia in extracellular SOD1 mutant-induced motor neuron death. Further development of immunotherapy for ALS can be anticipated by defining more crucial molecular target or manipulating monoclonal antibody.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	12,200,000	3,660,000	15,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経病態生化学

1. 研究開始当初の背景

筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS)は運動ニューロンが選択的に障害される予後不良の致死性神経変性疾患である。

殆どの患者は家族歴を持たない孤発性であり、原因不明である。しかしながら、一部の家族性患者でスーパーオキシドジスムターゼ1(SOD1)の突然変異が発見され、さらに変異SOD1を遺伝子導入したトランスジェニックマウスが優れた疾患モデルマウスの表現型を呈したことから、近年めざましい研究成果が集積しつつある。特に近年明らかとなった、変異SOD1タンパクによる運動ニューロン死の非細胞自律性(non-cell-autonomous)は運動ニューロンを取り巻く細胞・分子環境が病態の鍵となり、治療標的になることを示している。

研究代表者はこれまでに酵母two-hybrid法を用いて、変異SOD1の結合タンパクとして神経分泌タンパクであるクロモグラニンを同定し、クロモグラニンが細胞質タンパクである変異SOD1の分泌を促進し、細胞外の変異SOD1タンパクはミクログリアを活性化し、運動ニューロン毒性を示すことを明らかにした。さらに我々は細胞外変異SOD1毒性に関する仮説に基づき、G37R型SOD1マウスへのワクチン療法を試み、早期に治療を開始した場合に発症時期、延命期間とも延長することを発見した。一方、我々は高発現型のG93A型変異SOD1マウスに対してもワクチン療法を試みたが、有意な効果は認めなかった。しかしながら、G93A型変異SOD1タンパクで免疫したマウスからの抗血清をアフィニティー精製した抗体を直接脳室内注入したところ、有意な延命効果を認めた。しかしながら、ワクチンによる神経保護効果の機序は不明であり、さらに高発現型SOD1トランスジェニックマウスでワクチンが無効であった機序については免疫学的な検討も必要である。さらに抗血清はポリクローナル抗体であり、さらに変異SOD1特異的なモノクローナル抗体を用いることで治療効果が増す可能性もある。

一方、ミクログリアは多くの神経変性疾患

の病態の鍵を握る細胞として注目されている。我々は細胞外変異SOD1がミクログリアを活性化することを発見した。一方で活性化ミクログリアはALSの病態増悪に関与するという知見も集積しており、神経変性疾患におけるミクログリアの機能は大きな議論を呼んでおり、その解明はALSの理解と治療法の開発に有益な情報をもたらす。

2. 研究の目的

我々は、以前に低発現型であるG37R型変異SOD1トランスジェニックマウスに対して、変異SOD1組換えタンパクによるワクチン療法が有効であることを示したが、高発現型G93A SOD1トランスジェニックマウスでは無効であり、発現量の問題と考察した。しかしながら、近年、特にTリンパ球を中心とする、全身免疫反応の異常がSOD1マウスのみならずALS患者でも報告されており、抗原抗体反応に加えて、それに関連する免疫反応が治療効果の背景にある可能性がある。我々は免疫療法効果の機序について、今回は低発現型のG93A型SOD1トランスジェニックマウスを用いて同じ遺伝子型であるG93A SOD1組換えタンパクによるワクチン療法を行い、さらにワクチン療法の汎用化を念頭に置き、野生型SOD1をワクチンによる効果と比較しワクチンの作用機序を詳細に検討する。また、変異SOD1を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、新規の他動免疫療法開発を目指した。抗体投与方法として、髄腔内投与方法とハイブリドーマを含有する生体適合カプセルの開発を目指す。

さらに変異SOD1によるミクログリア活性化の機序と運動ニューロン毒性の機構を明らかにする。

3. 研究の方法

低発現型G93Aトランスジェニックマウスに対し、大腸菌にて精製したG93A型変異SOD1、野生型SOD1を非活性のアポ状態でRibiアジュバントとともに4回接種し、発症・寿命についてコントロール群(生食+アジュバント)と比較検討した。3回目の接種が終了した150日目に採血し、血清中whole IgG, IgGサブクラス(IgG1, IgG2b, 2c)をELISA法で測定し、発症、寿命との関連を調べた。発症時期

を体重減少と rotarod、寿命に対する効果を調べた。さらに生後 120 日、210 日における血清、脾臓、脊髄組織を採取し、抗 G93A SOD1 抗体 IgG サブクラスの解析と real-time PCR による脾臓、脊髄組織の Tumor necrosis factor alpha (TNF α), Interferon-gamma (IFN γ) (以上 Th1), transforming growth factor beta1 (TGF β 1; Th3), Interleukin-4 (IL4; Th2), FoxP3 (Treg), ROR γ t (Th17) 発現解析、さらに脊髄の免疫組織化学的解析を行った。さらに量免疫群におけるサイトカイン発現量をサスペンションビーズアレイ法を用いて定量した。

(他動免疫)

- 1) 変異 SOD1 特異認識モノクローナル抗体の開発 : Bulb C マウスに大腸菌由来の G93A SOD1 組換えタンパクを免疫しハイブリドーマを作製し野生型 SOD と G93A SOD1 タンパクをコートした ELISA により変異 SOD1 特異認識抗体をスクリーニングした。抗原特異性はさらにトランスジェニックマウスを用いた免疫組織化学やウェスタンブロット法によって確認した。
- 2) アルギネートカプセル化ハイブリドーマの開発 : アルギネートを細胞培養用の Hanks 液に溶解し、ハイブリドーマと懸濁液を作製し、さらに塩化バリウム、塩化カルシウム液上に滴下しカプセル形成させた後、細胞培地で培養し、細胞生存率、抗体産生効率や生体内でのマウスの腹腔内移植による抗体産生機能について解析した。
- 3) モノクローナル抗体髄腔内投与治療 : G93A SOD1 を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を用いて、微量浸透圧ポンプ (Alzet pump 2006) に 1.5 mg/ml で 200 μ l 充填し、岡山大学神経内科より技術供与を受けたマウス髄腔内カニューレーション法を用い、L4 椎弓より 6 週間持続注入を行った。コントロールとして生理食塩水を注入した。

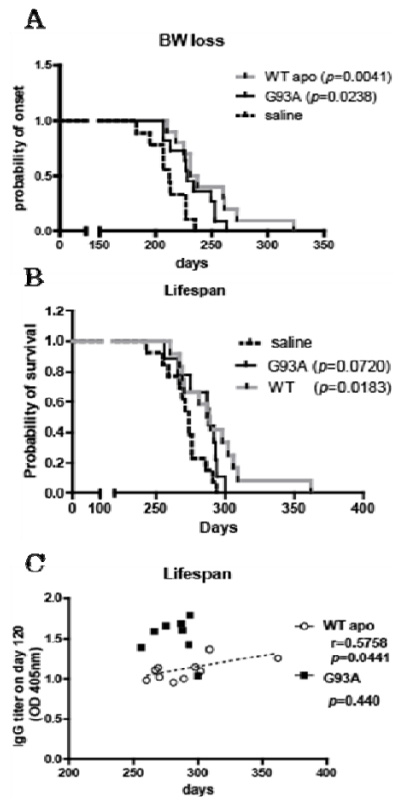
(ミクログリアの機能解析)

マウス胎児由来の運動ニューロン、ミクログリアの初代培養細胞を調整し培養液内に野生型、変異型 SOD1 を投与、ミクログリアの活性化を形態変化、サイトカインの発現を real-time PCR や ELISA によって検討し、運動ニューロン死の有無、CD14 受容体の関与についてモノクローナル抗体の同時投与や CD14 ノックアウトマウス由来のミクログリア初代培養を用いて検討した。

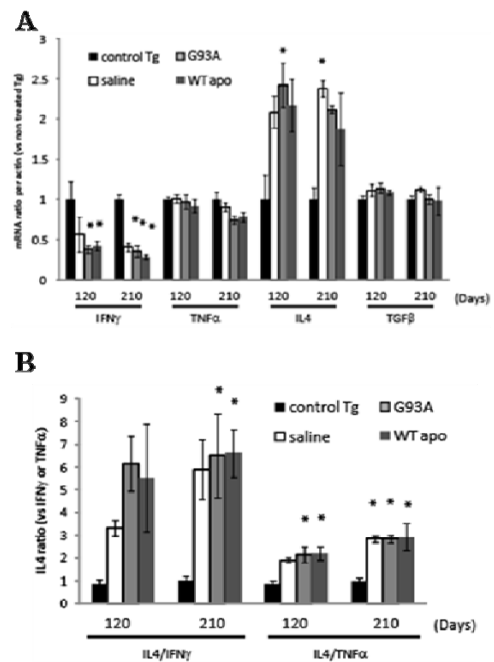
4. 研究成果

1. アポ型野生型 SOD1 のワクチンとしての有用性
WT-apo、G93A ワクチンとも G93A Gurd1 マウス

の発症を有意に遅延したが、生存延長効果は両者とも延長傾向を認めたが、統計学的には WT-apo のみ有意であり、WT-apo の抗体価は生存延長効果と正の相関を示した (下図)。



脊髄組織のサイトカイン mRNA 発現を real-time PCR 法で解析したところ、ワクチン群で著明な IL4/TNF, IL4/IFN γ 比の増加が認められた。(下図)



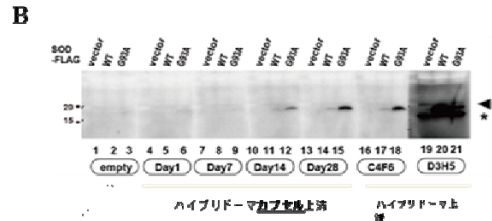
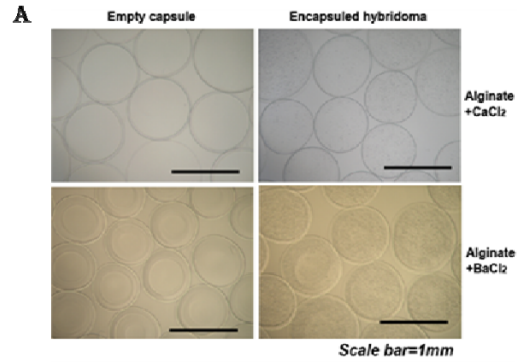
一方、IFN γ の転写因子である STAT4 は活性化ミクログリアに高発現しており、ミクログリアが IFN γ の発生源となることが判明した。野生型と変異型 SOD1 でワクチンの効果に異なった機序を解明するため、抗血清の IgG サブクラスと脾臓のサイトカイン発現を検討したところ 210 日齢マウスの解析では血清 IgG1/IgG2c 比が WT-apo ワクチンは G93A ワクチンより高値であり、G93A ワクチンにおいて Th2 サイトカインである IL4 の脾臓の発現が低下していた。さらに末梢血のサイトカイン定量において、G93A は野生型ワクチンに比べ TNF と IFN γ 値が高値であった。これらの獲得免疫系の反応性の違いが特にワクチンの効果に関連していると考えられた。今後ワクチンの投与経路、アジュバントの選択、また野生型 SOD1 を用いたオリゴマー等の分子標的の設計によってより有効なワクチン投与方法の開発が期待される。現在国際学術誌に修正投稿中である (Takeuchi et al. Induction of protective immunity by vaccination with non-metallated wild-type SOD1 in the mutant SOD1 transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*).

2. 変異型 SOD1 特異認識モノクローナル抗体の開発

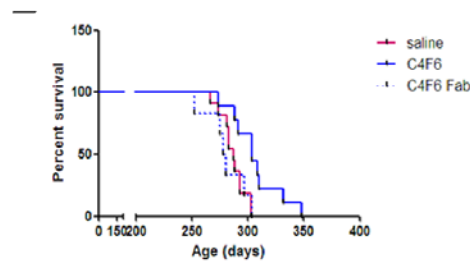
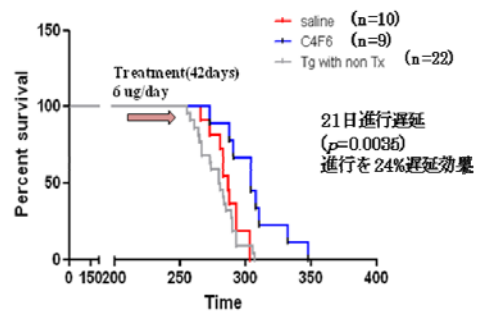
変異 SOD1 への反応性が高いハイブリドーマが 6 クローン得られ、さらに野生型 SOD1 との反応性の有無を検討し C4F6 という G93A SOD1 への反応性が高いクローンを得た。このモノクローナル抗体は、免疫染色、免疫沈降、ウェスタンブロット法によって変異型特異的な反応性を示した。本成果は米国に PCT 出願し、2009 年に特許を取得した。

3. アルギネートカプセル化ハイブリドーマの開発

アルギン酸ナトリウムを用いた微小カプセルの作成条件検討し、アルギン酸ナトリウムを用いた微小カプセルの作成を試みた。カプセル形成のためのキレート剤の最適化、サイズの小型化、ハイブリドーマの長期生存と抗体産生のための条件設定を行い、2 種類の条件に絞り込んだ。さらにキレート剤としてカルシウムとバリウムを用いることで剛性の強い小型カプセルの作製に成功した (下図)。さらに腹腔内投与により、血中の抗体が上昇することを確認した。しかし、ハイブリドーマの増殖がカプセル内で飽和すること、抗体価の上昇が期待したほどではない等の問題が判明し、抗体の微量浸透圧ポンプを用いた投与との利点を再検討する必要がある。



4. モノクローナル抗体による他動免疫療法変異タンパク特異認識抗体を用いた抗体療法；昨年度は変異 SOD1 認識モノクローナル抗体の髄腔内投与法を確立したが、変異 SOD1 特異認識抗体である C4F6 抗体の髄腔内投与は抗体濃度をやや低くし、投与期間を発症直後から 42 日とより長期にすると進行が対照群 (生理食塩水) に比べ、24%延長した。また C4F6 の Fab を精製し投与したところ無効であり、この効果は中和作用ではなく細胞外の変異 SOD1 の除去によると考えられた。本成果は第 22 回日本神経免疫学会シンポジウムで発表し、その内容はメディカルトリビューン誌で紹介された。今後組織化学的検討を



進め論文投稿をする予定である。

5. 細胞外変異 SOD1 によるミクログリア活性化と運動ニューロン死の関連

ミクログリア初代培養培地に組み換え野生型、G85R、G93A SOD1 を加え、培養培地を運動ニューロンに投与したところ細胞死を確認した。さらにミクログリアのサイトカイン発現量を real-time PCR と ELISA 法によって検討したところ、TNF α 、IL1 β 、iNOS の著明な誘導とスーパーオキシドアニオンの生成が確認され IGF-1 の発現が抑制されることを発見した。さらにこの反応は CD14 のモノクローナル抗体の同時投与や CD14 ノックアウトマウス由来のミクログリアでは抑制された。この結果を国際学術誌である *Glia* に投稿し採択された (文献 4)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- 1) Urushitani M, Sato T, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I. Synergistic effect between proteasome and autophagosome in the clearance of poly-ubiquitinated TDP-43. *J Neurosci Res* 2010, 88:784-797 (査読有)。
- 2) Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel SH. Extracellular mutant SOD1 induces microglial-mediated motoneuron injury. *Glia* 2010, 58:231-243(査読有)。
- 3) Gros-Louis F, Andersen PM, Dupre N, Urushitani M, Dion P, Souchon F, D'Amour M, Camu W, Meiningner V, Bouchard JP, Rouleau GA, Julien JP. Chromogranin B P413L variant as risk factor and modifier of disease onset for amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106, 21777-21782 (査読有)。
- 4) Sato T, Takeuchi S, Saito A, Ding W, Matsuura H, Bamba H, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal ligation induces transient nuclear exclusion of TDP-43 in

brainstem motor neurons. *Neuroscience* 2009, *Neuroscience* 2009, 164, 1565-1578 (査読有)。

- 5) Urushitani M, Abou Ezzi S, Matsuo A, Tooyama I, Julien JP. The endoplasmic reticulum-Golgi pathway is a major target for translocation and aggregation of mutant superoxide dismutase linked to ALS. *FASEB J* 2008, 22: 2476-2487. (査読有)。
- 6) Abou Ezzi S, Urushitani M, Julien JP. Wild-type SOD1 acquires properties of ALS-linked SOD1 mutants through oxidation. *J Neurochem* 2007, 102, 170-178 (査読有)。
- 7) Urushitani M, Abou Ezzi S, Julien JP. Therapeutic effects of immunization with mutant superoxide dismutase in mice models of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104, 2495-2500 (査読有)。
- 8) 漆谷 真. 家族性 ALS マウスモデルの免疫療法. 実験医学増刊号 2010, 3月号 (査読無)
- 9) 漆谷 真. 筋萎縮性側索硬化症に対するワクチン・抗体療法の展望. 難病とケア 2009, 15: 35-39 (査読無)
- 10) 漆谷 真. ALS モデルマウスの免疫療法と今後の展望. *Brain and Nerve* 2008, 60, 643-651 (査読無)

[学会発表] (計 14 件)

- 1) 漆谷 真. 「筋萎縮性側索硬化症の免疫療法について」 神経免疫学会 シンポジウム 2010 年 3 月 東京
- 2) Abou Ezzi S, Urushitani M, Larivière R, Julien JP. Neuronal overexpression of chromogranin A accelerates motor neuron degeneration in a mouse model of ALS. 20th International Symposium on ALS/MND, 8-10 December 2009, Berlin

- 3) 漆谷 真. 「免疫療法によるALSの治療戦略」第50回 日本神経学会総会 シンポジウム 2009年5月 仙台
- 4) Satoh T, Takeuchi S, Saitoh A, Hisa Y, Tooyama I, Urushitani M. Axonal strangulation induced peripheral accumulation and nuclear reduction of TDP43 in brainstem motor neurons. Annual Meeting of Neuroscience. 2008, November, Washington D.C.
- 5) 漆谷 真. 第17回 日本アポトーシス研究会 学術集会 「筋萎縮性側索硬化症におけるミスフォールドタンパクの多様性機序」 2008年8月 京都
- 6) Dupre N, Gros-Louis F, Andersen P, Urushitani M, Meininger V, Salachas F, Camu W, Bouchard JP, Rouleau G, Julien JP. Genetic screening study of CHGA and CHGB variants in a cohort of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Annual meeting of American Academy of Neurology, 2008 April, Chicago
- 7) Abou Ezzi S, Urushitani M, Julien JP. Oxidized wild type SOD1 acquires toxic properties reminiscent of mutant SOD1 species. Annual Meeting of Neuroscience. Society for Neuroscience 2007, November, San Diego
- 8) Zhao W, Beer DR, Henkel JS, Zhang W, Urushitani M, Julien JP, Appel S. The Activation of Microglia by Mutant SOD1 Protein: A Novel Link between Innate Immunity and ALS. 59th Annual Meeting, American Academy of Neurology, 2007 May, Boston

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：ケト・エノール互変異性を利用した診断薬

発明者：遠山育夫、漆谷 真、田口弘康、白井伸明、平尾浩一、加藤雅也、柳沢大治郎
 権利者：滋賀医科大学
 種類：特許
 番号：特願 2009-45531
 出願年月日：2009/2/27
 国内外の別：国内、PCT

○取得状況 (計1件)

名称：Antibodies and their use in the treatment, prevention and diagnosis of a disease associated with SOD1 abnormalities
 発明者：Jean-Pierre Julien, Makoto Urushitani
 権利者：Université Laval
 種類：特許
 番号：WO/2007/025385
 取得年月日：2007/8/3
 国内外の別：国外 (米国)

〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.shiga-med.ac.jp/~uru/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

漆谷 真 (URUSHITANI MAKOTO)
 滋賀医科大学 分子神経科学研究センター
 研究者番号：60332326

(3) 連携研究者

高橋 良輔 (TAKAHASHI RYOSUKE)
 京都大学 医学部 教授
 研究者番号：90216771

舘野 美成子 (TATENO MINAKO)
 国立精神神経センター 神経研究所 室長
 研究者番号：50332325